UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTE MIXTE de MEDECINE et de PHARMACIE

ANNEE 1962 N° 206

MESURE DE L'ACTIVITÉ DE LA MICROFLORE PROTEOLYTIQUE DES SOLS

THESE

pour le Doctorat en Pharmacie

(Diplôme d'Université)

Présentée et soutenue publiquement en Décembre 1962

devant la

Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de Toulouse

PAR

JACQUES MALAVIALLE

MEMBRES DU JURY

MM. BOUISSET, *Président.*
G. ROUX
P. BOURBON
J. BREUILLAUD
Assesseurs
G. PITET, *Suppléant.*

IMPRIMERIE PARISIENNE
16, Place du Salin, 16
TOULOUSE
—
1962

Mesure de l'Activité de la Microflore Protéolytique des Sols

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546525_0094

UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTE MIXTE de MEDECINE et de PHARMACIE

ANNEE 1962 N° 206

MESURE DE L'ACTIVITÉ DE LA MICROFLORE PROTEOLYTIQUE DES SOLS

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

THESE

pour le Doctorat en Pharmacie

(Diplôme d'Université)

Présentée et soutenue publiquement en Décembre 1962
devant la
Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de Toulouse

PAR

JACQUES MALAVIALLE

MEMBRES DU JURY

MM. .BOUISSET, *Président.*
G. ROUX
P. BOURBON
J. BREUILLAUD
Assesseurs
G. PITET, *Suppléant.*

IMPRIMERIE PARISIENNE
16, Place du Salin, 16
TOULOUSE
—
1962

UNIVERSITE DE TOULOUSE

FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

TABLEAU DU PERSONNEL

DOYEN.	M.	LAZORTHES
1er ASSESSEUR		BLANC
2e ASSESSEUR		N
Doyens Honoraires.	MM.	GORSE
		CALVET
		LEFEBVRE
		BRUSTIER
Professeurs honoraires. . . .	MM.	RIBAUT
		VALLOIS
		NANTA
		DUCUING
		TAPIE
		DELAS.
		RISER.
		SOULA.

SECTION MÉDECINE - PROFESSEURS

Clinique Médicale.	MM.	MERIEL
Clinique Médicale.		GADRAT
Clinique chirurgicale et gynécologique.		FABRE (P.)
Clinique chirurgicale et du Cancer.		GRIMOUD
Clinique chirurgicale infantile et Orthopédie.		VIRENQUE
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques. . . .		BAZEX
Clinique des maladies de la Tuberculose et Pathologie interne.		MOREL
Clinique des maladies des voies urinaires.		LHEZ
Clinique médicale infantile et Puériculture.		SOREL
Clinique de Neurologie et Psychiatrie.		GERAUD
Clinique obstétricale.		GUILHEM
Clinique odonto-stomatologique.		CADENAT (H.)
Clinique ophtalmologique. .		CALMETTES
Clinique O.R.L. et de chirurgie maxillo-faciale.		CALVET
Rhumatologie.		RUFFIÉ (R.)
Cliniq. traumatolog. des membres		RIEUNAU
Accouchement et obstétricie sociale		PONTONNIER
Anatomie.		LAZORTHES
Anatomie appliquée.		POULHES
Anatomie pathologique. . . .		FABRE (J.)
Bactériologie, Hygiène et Médecine sociale.		ANDRIEU
Chimie biologique.		VALDIGUIE
Electro-Radiologie.		MARQUES
Embryologie générale.		BROUSSY (Jean)
Histologie.		BIMES
Hydrologie thérapeutique et climatologie.		DARNAUD
Médecine Légale du Travail		PLANQUES
Médecine Sociale.		BOUNHOURE
Parasitologie.		BOUISSET
Pathologie chirurgicale. . .		DAMBRIN
Pathologie générale et Médecine expérimentale. . . .		SENDRAIL
Physico-Chimie.		AUVERGNAT
Physiologie.		LAPORTE (Y.)
Physiologie appliquée et Pharmacologie.		BAISSET
Physique biologique et médicale.		BUGNARD
Propédeutique médicale. . . .		N.
Thérapeutique.		DARDENNE

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

Anatomie générale et comparée.	MM.	COULOUMA
Pathologie médicale.		LAPORTE (J.)
Bactériologie.	Mme	ENJALBERT

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Biochimie médicale.	MM.	DOUSTE-BLAZY
Physique médicale.		BRU

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Anatomie	MM.	BASTIDE
Anatomie Pathologique. . . .		BOUISSOU
Anesthésiologie		LARENG
Carcinologie		ESTRADE
Histologie et Embryologie. . . .		PLANEL
Médecine générale		MONNIER
Oto-Rhino-Laryngologie . .		CLAUX
Parasitologie.		RUFFIE (J.)
Pathologie expérimentale . .		GLEIZES
Physiologie.		MONTASTRUC
Physiologie		BESSOU
Physique médicale		COMMANAY

AGREGES

Médecine générale.	MM.	RIBAUT
		CALAZEL
		RASCOL
Chirurgie générale		ENJALBERT
		FICAT
		PASQUIE
		SOUQUET
		SARRAZIN
Dermatologie et Syphiligraphie . . .		DUPRE
Hydrologie		DENARD
Médecine légale		GREZES-RUEFF
Obstétrique		ESPAGNO
Pédiatrie		BARDIER
Pneumo phtisiologie.		DELAUDE

AGRÉGÉS LIBRES

Anatomie	THOMAS
Ophtalmologie	DEODATI
Pathologie Chirurgicale . .	DIEULAFE

SECTION PHARMACIE - PROFESSEURS

Botanique et cryphogamie.	Mme	DULUCQ-MATHOU
Chimie analytique, Toxicologie et Hygiène industrielle	M.	BOURBON
Chimie pharmaceutique. . . .		BLANC
Matière Médicale.		VINCENT
Pharmacie chimique Pharmacodynamie.		CAUJOLLE
Pharmaceutique galénique		STANISLAS
Zoologie	M.	ROUX

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

Pharmacie.	M.	COUTURIER

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Sciences Naturelles.	Mme	CAUJOLLE

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Microbiologie.	MM.	BREUILLAUD
Sciences Physiques.	M.	PITET
Toxicologie		BROUSSY (G.)

PERSONNEL ADMINISTRATIF

Secrétaire Principal.	M.	ROCHE
Secrétaire.		BERRUT

La Faculté déclare n'être pas responsable des opinions émises par les candidats
(Délibération en date du 12 mai 1891)

A MA FEMME

A MA FILLE

A MES PARENTS

A Notre Maitre et Président de thèse :

MONSIEUR LE PROFESSEUR L. BOUISSET

Officier de la Légion d'honneur

Médaille Militaire

Professeur de Parasitologie à la Faculté

Vous avez bien voulu, dès le début de nos études, nous accueillir au laboratoire de microbiologie. Nous vous remercions de la bienveillance que vous avez bien voulu nous manifester et nous vous prions d'accepter l'expression de notre profonde déférence.

A Notre Jury de Thèse :

MONSIEUR LE PROFESSEUR G. ROUX

Professeur de Zoologie

Nous vous exprimons nos respectueux remerciements pour l'honneur que vous nous faites en acceptant de siéger à notre jury de thèse.

MONSIEUR LE PROFESSEUR P. BOURBON

Professeur de Toxicologie et d'Hygiène Industrielle

Avec notre respectueuse reconnaissance.

MONSIEUR LE PROFESSEUR J. BREUILLAUD

Maître de Conférences de Sciences Naturelles

Nous n'oublions pas les conseils et l'aide que vous nous avez apporté tout au long de nos études ; veuillez accepter dans ce travail que vous avez inspiré et guidé, l'expression de notre profonde gratitude et de notre respectueux attachement.

MONSIEUR LE PROFESSEUR G. PITET

Maître de Conférences de Sciences Physiques

En vous remerciant d'avoir bien voulu accepter de juger notre travail.

A MONSIEUR G. MICHEL

Chef de Travaux Pratiques de Microbiologie

A MONSIEUR V. GRIZOU

En les remerciant de leur précieuse collaboration à la réalisation de ce travail.

A NOS AMIS DU LABORATOIRE
DE MICROBIOLOGIE

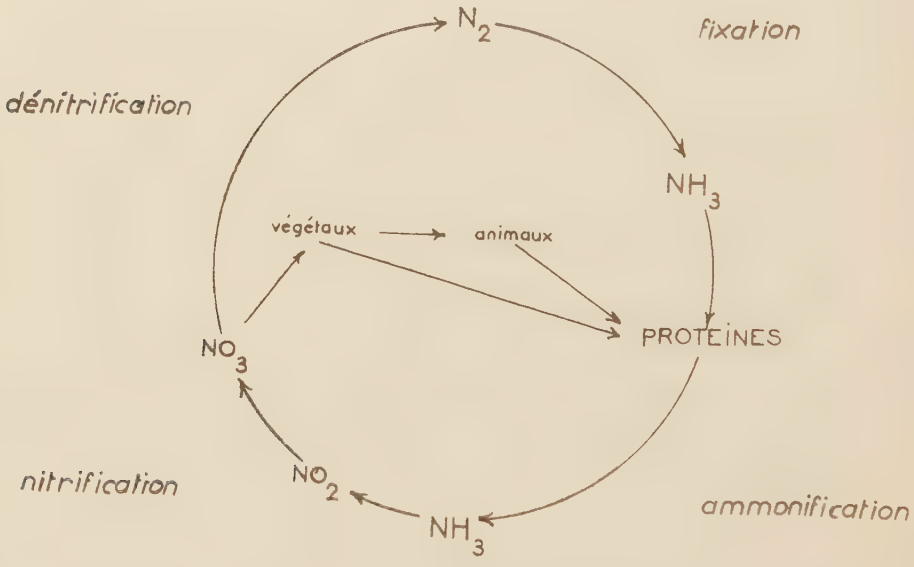
INTRODUCTION

La Microbiologie des sols constitue un des chapitres essentiels de l'étude de la vie à la surface de la terre ; les représentants du règne animal qui sont incapables de synthétiser à partir d'éléments minéraux leur propre substance sont entièrement dépendants du règne végétal. Pour réaliser cette synthèse, les végétaux utilisent le carbone atmosphérique et l'azote minéral, carbone et azote régénérés par une minéralisation microbienne des composés organiques provenant des végétaux et des animaux après leur mort ou par fixation de l'azote moléculaire atmosphérique. L'ensemble de ce phénomène constitue donc un cycle vital où carbone et azote passent alternativement sous leur forme minérale et organique.

La protéolyse bactérienne constitue la première phase de cette minéralisation nécessaire à la fermeture du cycle de l'azote, phase essentielle car la presque totalité de l'azote naturellement introduit dans le sol, l'est sous forme organique, protéique : azote des tissus végétaux et animaux des engrais des fumiers naturels ou artificiels et seul l'azote minéral est utilisable par les végétaux.

Ce passage de l'azote protéinique à l'azote ammoniacal est classé sous le grand chapitre de l'ammonification.

Nous avons dans ce travail, essayé d'approfondir ce phénomène et nous avons étudié plus particulièrement la dégradation des protéines, première étape de ces réactions en chaîne indispensables à la vie.



CYCLE DE L'AZOTE

Première Partie

MESURE DE L'ACTIVITE DE LA MICROFLORE PROTEOLYTIQUE DES SOLS

I. — MESURE DE L'ACTIVITE DE LA MICROFLORE PROTEOLYTIQUE DES SOLS

A. — Principe des Techniques déja utilisés

L'étude de la protéolyse au sein des sols rentre dans le cadre de la mesure de l'activité des différents groupements physiologiques. Le principe de cette mesure est le suivant : placer un groupement microbien physiologique au sein de la microflore totale dans des conditions telles que son activité soit électivement stimulée et puisse être quantitativement appréciée.

Plusieurs variantes peuvent être utilisées pour l'étude de la protéolyse :

1° utiliser la terre elle-même après l'avoir enrichie en un substrat précis ; cette méthode permet l'étude de la protéolyse *in situ*.

Technique proposée par H. de Barjac [7] : enfouir au mois d'Avril et laisser pendant un mois dans le sol à 35 cm de profondeur 3 sachets de gaze stérile

contenant chacun un foie de cobaye prélevé aseptiquement. Au bout de ce temps, l'aspect du contenu permet de constater une protéolyse plus ou moins accentuée.

Pour isoler les souches : on dilacère une partie des foies dans de l'eau stérile et on réalise des séparations sur gélose à l'extrait de terre. On opère soit sur gélose en boîte de pétri pour les aérobies, soit en gélose profonde pour les anaérobies.

2° Substituer à la terre un milieu solide électif que l'on ensemence avec des dilutions suspensions du sol étudié.

Technique proposée par J. Ponchon [11] : principe : — ensemencer des plaques de sérum coagulé avec des dilutions de terre et compter le nombre de colonies s'entourant d'une cupule de liquéfaction du sérum.

Mode opératoire : du sérum normal de cheval est stérilisé par filtration sur bougie Chamberland L 3.

— Répartir à raison de 25 ml par boîte dans des boîtes de pétri de 10 ml stériles ; placer les boîtes avec leur couvercle dans une étuve à 85° pendant une heure.

— Avec une compresse stérile éponger l'eau de condensation dans les couvercles des boîtes et retourner celles-ci

— Préparer une émulsion de terre et faire les dilutions convenables.

Ensemencer les boîtes avec une goutte de chaque dilution sur toute leur surface.

— Incuber à 28° couvercle en-dessous.

— Lire après trois à six jours. Compter alors les colonies entourées d'une cupule de liquéfaction creusant la surface du sérum coagulé.

3° On peut utiliser des milieux liquides électifs répartis en tube et on ensemence avec des suspensions-dilutions de terre.

Technique proposée par J. Lajudie *et* H.-A. Chalvignac [8] : le substrat utilisé est la gélatine. on ensemence avec des suspensions-dilutions du sol étudié un milieu salin additionné de gélatine, dont la composition est la suivante :

— gélatine 30 gr ;

— solution de Winogradsky 50 gr ajuster à pH 7,3 ;

— eau de source 950 ml.

L'ensemencement est réalisé avec des dilutions allant de 10^{-1} à 10^{-10}. La lecture se fait le premier, deuxième, troisième, quatrième, septième et dixième jour. On place les tubes à la glacière pendant 1 h 30 : sont positifs ceux qui restent liquides (liquéfaction de la gélatine). Les dilutions limites actives aux différents jours permettent de tracer une courbe représentative de l'activité protéolytique du sol étudié.

4° Enfin, une étude quantitative et qualitative de la protéolyse microbienne peut être faite en ensemençant une quantité connue du sol étudié dans un volume défini d'un milieu électif. On étudie ensuite et en fonction du temps les produits de dégradation du métabolite.

C'est cette dernière variante que nous avons adoptée et que nous avons appliquée à l'étude de l'activité protéolytique des sols.

B. — Les Conditions expérimentales de notre Analyse.

Milieu choisi : Le substrat utilisé est le plasma animal lyophilisé remis en suspension dans de l'eau distillée stérile de façon à obtenir une concentration en protéines d'environ 50 gr par litre. On place dans un erlenmeyer de 6 litres, 1,400 litre de cette solution auquel nous ajoutons 10 % en volume d'extrait de terre. L'ensemencement est réalisé à partir de terre totale préalablement tamisée (tamis module 20) à raison de 1 gr de terre (en poids sec) pour 100 ml de mélange.

Parmi les différentes techniques utilisables et décrites ci-dessus, nous avons choisi cette méthode pour les raisons suivantes :

— Bien que dans son traité de microbiologie des sols Waksman [16] décrivant les techniques d'étude de la microflore tellurique en milieu liquide, leur reproche d'être peu écologiques, « de ne permettre le développement que d'une partie seulement des microorganismes réellement actifs dans le sol et de donner ainsi une vue limitée du domaine », il est en fait très difficile de réaliser dans des conditions écologiques strictes une étude précise. Nous avons donc préféré réaliser nos cultures, non dans un

milieu spécifique et qui serait très sélectif, mais au contraire dans un milieu très riche et dans des conditions telles que la plupart des germes actifs dans le sol puissent s'y développer.

Nous avons donc utilisé comme substrat le plasma animal qui contient tous les facteurs nécessaires à la croissance bactérienne [19] et des protéines en quantité suffisante pour nous permettre de suivre leur devenir et l'apparition des produits de clivage.

L'addition d'extrait de terre au milieu a pour but de l'enrichir en facteurs de croissance présents dans le sol.

Préparation de l'extrait de terre : mélanger à poids égal terre et eau de source. Laisser macérer 24 heures à la température du laboratoire. Porter à l'autoclave 1 heure à 130°. Laisser décanter et filtrer à chaud sur papier. Vérifier le pH qui doit être voisin de la neutralité. répartir en récipients bouchés au coton, stériliser 20 minutes 112°.

La quantité de terre ensemencée : (1 gr évaluée en poids sec) pour 100 ml de milieu a été choisie pour donner au phénomène une amplitude suffisante. On peut ainsi mieux préciser le début de la protéolyse et mettre en évidence l'action des différentes vagues microbiennes qui succèderont.

La température d'incubation a été fixée à 28°, température généralement utilisée par les différents auteurs pour les analyses microbiologiques du sol.

La solution à ensemencer est placée dans un erlenmeyer de 6 litres pour les raisons suivantes :

— après ensemencement de 2 milieux identiques contenant la même quantité de substrat avec les mêmes quantités de terre nous avons créé dans l'une de ces cultures une anaérobiose relative, la protéolyse a été beaucoup plus longue à s'effectuer dans la culture anaérobie.

Il en est de même après addition de réductose à la culture le temps de protéolyse est allongé.

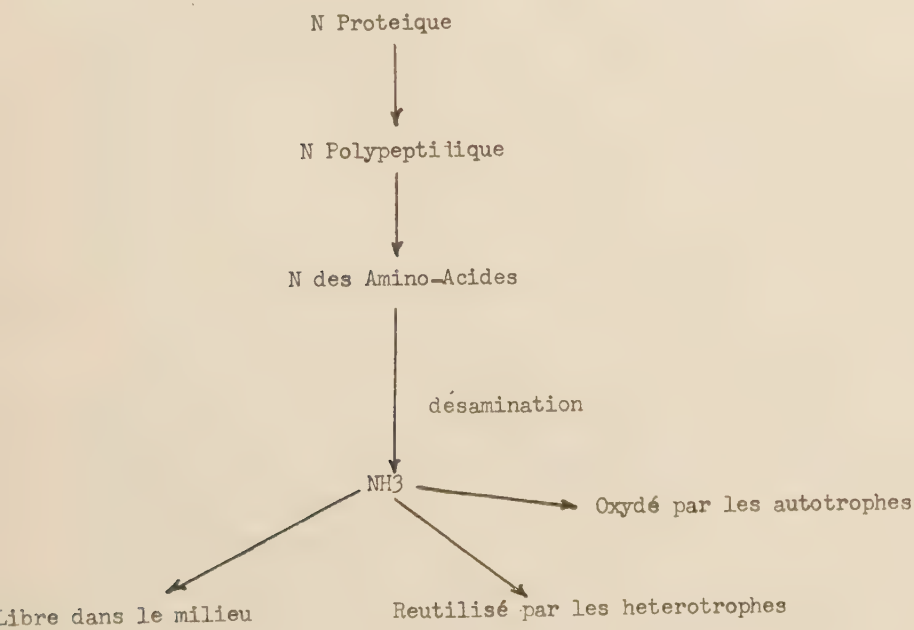
— Nous avons ainsi remarqué le rôle important joué par l'aérobiose et le meilleur déroulement du phénomène dans un milieu bien oxygéné.

De ces essais préliminaires nous avons conclu que la protéolyse était un phénomène surtout aérobie et en plaçant 1.500 litre de substrat dans un erlenmeyer de 6 litres nous avons créé une surface d'oxygénation importante. Ce volume est de plus nécessaire pour éviter que les prélèvements journaliers indispensables à nos analyses ne perturbent l'équilibre biologique du milieu.

LE PRINCIPE DE L'ANALYSE

Nous partons d'un milieu très riche contenant de 10 à 50 gr par litre de protéines plasmatiques. Le volume de la solution protéinique ensemencée étant de 1 litre 400 nous avons au départ 6-7 gr d'azote protéinique par litre. Sous l'action des bactéries protéolytiques, ces pro-

téines vont être dégradées en polypeptides puis en acides aminés. Ces amino acides sont alors désaminés et libèreront de l'ammoniac. Mais cet ammoniac libéré est diversement utilisé par la microflore : une partie sert d'aliment azoté à de multiples microorganismes hétérotrophes et est ramené par transamination sous forme de protéine microbienne et fongique ; une autre est oxydée par les autotrophes en nitrites et nitrates ; une dernière partie enfin reste libre dans le milieu de culture. (Notre technique qui évite la perte de celle-ci par absorption sur les complexes argilo-humiques du sol). Le schéma de la protéolyse au sein des sols se résume donc ainsi :



Nous suivrons pour chaque sol analysé les phases essentielles de cette chaîne de dégradation.

Le devenir de l'azote protéinique : on dose chimiquement tous les jours l'azote protéinique du milieu et on établit d'autre part, le pourcentage de protéines dégradées au dixième jour de culture, cette mesure nous permettant de comparer l'activité protéolytique de sols pédologiquement différents.

L'apparition des produits de dégradation :

a) mise en évidence des amino-acides apparaissant ou disparaissant du milieu d'ensemencement : estimation quantitative ;

b) mise en évidence de l'utilisation du tryptophane (indol.) ;

c) apparition de SH2 ;

d) dosage de NH3 libre du milieu.

Nous suivrons enfin l'évolution du pH.

Pourquoi avons-nous adopté ce protocole ?

Les différents dosages que nous effectuons, vont permettre de « contrôler » la protéolyse, d'en fixer le début, de constater la rapidité plus ou moins grande du phénomène c'est-à-dire d'apprécier sa vitesse. Le dosage des amino-acides et de l'ammoniac va indiquer le devenir des produits de clivage, la rapidité plus ou moins grande avec laquelle ils sont réutilisés en fonction de chaque sol étudié. D'autre part, cette étude dynamique du phénomène pour-

ra permettre de mesurer l'activité de la microflore. Lorsque un groupe microbien prédominera dans le milieu de culture à un moment donné, nous pourrons suivre son mode d'action et par là même déterminer le rôle qu'il joue dans le phénomène.

TECHNIQUES UTILISEES

1° Devenir de l'azote protéitique :

La technique employée est une semi microméthode photométrique décrite par Gornall [6]. L'addition à une solution de protéine de sulfate de cuivre et de soude produit une coloration violette stable dont (dans des conditions déterminées) l'intensité est proportionnelle à la concentration en protéines. La mesure a lieu par électrophotométrie. La densité optique reportée sur une courbe d'étalonnage nous donne la concentration en protéines du liquide à analyser.

A) *Etalonnage de la courbe de référence :*

Nous utilisons un sérum normal frais dont on détermine le titre en protéines totales par la méthode pondérale de coagulation par la chaleur. On prépare dans un deuxième temps, à partir de ce même sérum titré, une série de 8 dilutions (à l'aide de la solution de NaCl à 9 ‰) s'échelonnant de 1/10 à 1/100.

Nous avons utilisé la gamme ci-dessous :

1/10 1/15 1/20 1/30 1/40 1/50 1/80 1/100

sur cette série de dilutions on réalise le dosage des protéines d'après le protocole suivant :

Dans un tube à centrifuger de 10-12 cm^3 nous plaçons :

dilution du sérum	1 ml.
solution d'A. acétique à 1 % ..	0,13 ml.
solution saturée de NaCl	0,23 ml.

Après avoir mélangé, nous plongeons le tube jusqu'au-dessus du niveau du mélange. dans un bain-marie bouillant pendant 15 mn. Centrifugation à 5 000 tours minutes pendant 5 mn. On décante le liquide surnageant et l'on essuie l'intérieur du tube à centrifuger à l'aide d'un papier filtre. Le précipité est remis en suspension dans 1 ml de solution chlorurée à 9 gr par litre. Nous ajoutons alors 4 ml de réactif cuprosodique de Gornall.

Réactif cuprosodique de Gornall :

Sulfate de cuivre (S04 CU, 5 H20) .	1,5 gr
Tartrate double de potassium et de sodium	6 gr
Soude (exempte de carbonates) ...	30 gr
Iodure de potassium	1 gr
Eau Qsp	1000 ml.

Après 30 mn à 20-25°. la coloration violette qui se développe reste stable pendant 24 heures.

Nous avons effectué les mesures de densité optique à l'électrophotomètre avec un filtre de 550 mμ. Sur un

papier millimétré nous portons en abcisses les poids de protéines exprimés en mg et en ordonnées les densités optiques obtenues pour chaque dilution. La courbe obtenue est une droite qui s'infléchit seulement pour les dilutions extrêmes de 1/80e et 1/100e.

B) *Dosage proprement dit :*

Le liquide d'ensemencement à analyser est prélevé à l'aide d'une pipette stérile et centrifugé 10 minutes à 5 000 tours minute. Cette manipulation a pour but de séparer les corps microbiens et nous permet d'obtenir un surnageant parfaitement limpide. Ce surnageant est dilué au 1/10e avec de l'eau physiologique (la concentration optimum en protéines de la solution à traiter étant comprise entre 2 et 6 gr ‰).

Nous effectuons sur 1 ml de cette dilution la précipitation des protéines et coloration par le réactif de Gornall comme nous l'avons décrit précédemment. D'après la densité optique obtenue et en se reportant à la courbe d'étalonnage, nous obtenons la concentration en protéines du liquide analysé.

2° Les produits de dégradation :

A) *Mise en évidence des acides aminés apparaissant ou disparaissant du milieu d'ensemencement : leur évaluation quantitative approximative :*

Après préparation de la solution à analyser, on met en évidence les acides animés par chromatographie des-

cendante suivie d'électrophorèse et révélation des taches par la ninhydrine acétique [14].

Préparation de la solution à chromatographier :

La chromatographie des amino-acides d'un mélange complexe exige tout d'abord l'élimination des substances chromatographiquement gênantes : protéines, glucides, lipides, sels minéraux. Cette élimination est réalisée par l'emploi d'une résine échangeuse de cations. Nous avons utilisé une résine polystyrène sulfonée (permutite 50) selon la technique préconisée par Boulanger et Bisserte [2]. Le comportement de la permutite 50 peut d'après ces auteurs, se résumer ainsi : tous les amino-acides du mélange sont fixés et peuvent être quantitativement déplacés par l'ammoniaque dilué. Dans ces conditions les cations minéraux ne sont pas élués, les oses, les dérivés lipidiques et les protéines non adsorbés sont éliminés avec les premières portions du liquide effluent.

Préparation de la colonne de permutite :

Elle est constituée par un tube de verre d'un diamètre de 12 mm remplie sur une hauteur de 20 cm avec de la permutite 50 (calibrée entre les tamis 25 et 50). La résine fonctionne en cycle hydrogène. Elle est régénérée par HCl. 2N ; puis lavée à l'eau distillée jusqu'à résistivité constante du liquide effluent.

Passage de la solution à chromatographier :

10 ml de liquide de culture centrifugé sont dilués sous un volume de 50 ml environ et passés sur la colonne de permutite régénérée. Pour obtenir une bonne fixation

des amino-acides sur la résine. Le débit ne doit pas être supérieur à 20 gouttes à la minute.

Lavage de la colonne par 200 millilitres environ d'eau distillée.

Passage de NH4 OH 2N. puis après réaction positive à la phénolphtaléine à la sortie de la colonne, passage de NH4 OH 0,3 N. Lors du passage du front de l'ammoniaque, les acides aminés et les petits peptides sont déplacés en totalité, et l'on recueille 50 ml environ de ce liquide que l'on concentre.

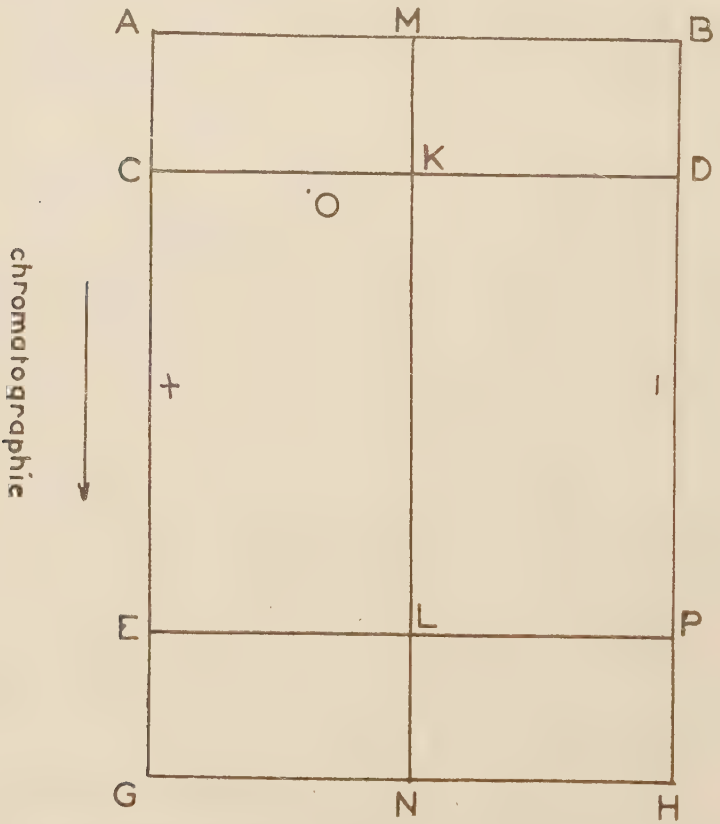
On réalise cette concentration au bain-marie vers 56-60°. Lorsque ce liquide d'élution aura atteint un volume de 10 ml la concentration des amino-acides sera identique à celle du milieu de départ. On déposera sur le papier à chromatographie un échantillon de 10 mm³ de cette solution, puis un second essai sera effectué avec un échantillon de 10 mm³ de la solution obtenue en concentrant les 10 ml précédents à 1 ml. Nous aurons ainsi sur le chromatogramme les acides aminés en concentration 10 fois supérieure à celle existant dans le milieu de culture. Ces 2 essais ont pour but :

D'une part de mettre en évidence les amino-acides même lorsque leur concentration dans le milieu est faible, d'autre part, de favoriser et de rendre plus précise l'estimation quantitative de ces amino-acides.

Identification et estimation quantitative des amino-acides par chromatoionophorèse.

Nous réalisons d'abord une chromatographie descendante. Nous avons utilisé comme support de migra-

tion le papier WATHMAN n° 3. Nous déposons à l'aide d'une micropipette de verre très effilé une tache de départ de 5 mm de diamètre environ correspondant à un volume d'extrait de l'ordre de 1/10^{e} de mm^{2}. Ce spot est déposé en un point 0 distant de 7 cm de la ligne médiane MN et de 8 cm de l'extrémité supérieure de la feuille.



Le solvant utilisé pour la chromatographie est :

le mélange butanol 125 ml
acide acétique 30 ml
eau 125 ml
} *phase supérieure*

On met la phase inférieure dans un petit bécher pour saturer l'atmosphère du bac de chromatographie. La migration (de 16 heures environ) est arrêtée lorsque le solvant commence à s'écouler du papier. On sèche alors le papier dans une étuve à 100° pour chasser les dernières traces d'acide acétique et on effectue dans la première dimension une électrophorèse sur papier, le sens du courant étant perpendiculaire au sens d'écoulement du solvant. L'appareil de Machebeuf, Rebeyrote et Dubert et les grands bacs de Leres ont été utilisés sous 400 volts. La migration est de 5 heures. Le tampon utilisé est celui de pH 8,6.

véronal acide	1,84 gr
véronal sodique	10,30 gr
eau QSP	1 000 ml

On installe la feuille sur le chevalet médian de l'appareil tout en laissant ses deux extrémités tremper suffisamment dans le tampon, puis on l'humecte délicatement et complètement avec ce même tampon à l'aide d'une pipette de 10 ml en prenant soin particulièrement de laisser le tampon s'écouler goutte à goutte. On laisse la zone où se trouvent les amino-acides ayant migré par chromatographie s'imbiber par capillarité et on branche l'appareil. Après un temps de migration convenable le papier est séché à l'étuve à 100° puis révélé par pulvérisation d'une solution de ninhydrine à 0,1 % dans le butanol saturé d'eau additionné de 1 % d'acide acétique, puis remise à l'étuve pendant quelques minutes jusqu'à obtenir les colorations violettes, bleues ou gris violet suivant la nature de l'acide aminé [9].

Durant la chromatographie descendante réalisée en premier lieu les amino-acides se séparent verticalement d'après leur rF [10].

— rF des acides aminés rencontrés le plus fréquemment au cours de notre expérimentation avec le solvant butanol acétique :

Alanine	0,39	phényl alanine ..	0,66
glycocholle	0,33	sérine	0,31
leucine	0,72	valine	0.56
lysine	0,18		

Soumis à l'électrophorèse ces amino-acides migrent soit vers l'anode : acide aspartique, acide glutamique, soit vers la cathode : leucine, valine, alanine.

Si l'on réalise une chromatoionophorèse sur un mélange d'amino-acides connus, on obtient une « carte » d'acides aminés qui nous permettra ensuite d'identifier les spots révélés au cours de l'expérimentation. Mais comme le rF peut varier sensiblement selon que l'amino-acide est seul ou qu'il fait partie d'un mélange plus complexe, il nous a paru préférable de réaliser des témoins internes.

Ex. : Si, après chromatoionophorèse de l'échantillon à analyser nous identifions un spot à de la valine, il est possible de contrôler ce résultat en réalisant une deuxième migration après avoir surchargé le mélange à analyser en valine.

Si l'acide aminé est vraiment de la valine nous aurons une tache unique. Dans le cas contraire nous aurons deux spots différents.

— La coloration de la tache après révélation par la ninhydrine acétique nous donnera aussi de précieuses indications quant à la nature de l'amino-acide.

Coloration de quelques amino-acides après révélation par la ninhydrine acétique :

alanine	violet	leucine	violet
alanine	bleu	phényl alanine	bleu-violet
glycocolle ..	rose-violet	sérine	brun-rouge

Dosage approximatif des amino-acides :

Nous comparons l'intensité et l'ordre de grandeur des taches obtenues par électrophorèse et chromatographie avec des spots témoins correspondants à des quantités croissantes d'un acide aminé donné (1). Quoique assez imprécise cette technique nous a paru suffisante car dans notre travail seules sont interprétables les grosses variations du taux des amino-acides.

B) *Mise en évidence de l'indol :*

Nous effectuons directement sur le milieu de culture la recherche de l'indol par le réactif d'Erlich dont la composition est la suivante :

Paradiméthylaminobenzaldehyde . .	3,50 gr
alcool amylique	75 ml

Après dissolution on ajoute

acide chlorhydrique	25 ml

En présence d'indol il se forme un anneau rouge caractéristique à la surface de séparation.

C) *Apparition de SH2 dans le milieu de culture.*

Elle est déterminée par le noircissement plus ou moins intense et rapide d'un papier imbibé de sous acétate de plomb préalablement séché à l'étuve et que l'on place dans l'atmosphère du ballon.

D) *Dosage de l'ammoniac dans le milieu d'ensemencement.*

Nous avons utilisé pour ce dosage l'appareil de Parnas et Wagner. 10 ml du milieu étudié sont centrifugés 10 mn à 5 000 tours minute. On prend 5 ml du surnageant limpide que l'on traite dans l'appareil de Parnas et Wagner par 5 ml de lessive de soude concentrée. L'ammoniac déplacé par la soude est entraîné par la vapeur d'eau et reccueilli dans un erlenmeyer contenant 10 ml d'acide sulfurique N/10. L'excès d'acide non combiné à l'ammoniac est titré en retour par une solution N/10 de soude.

Nous avons exprimé dans nos courbes l'ammoniac dosé dans le milieu de culture, en azote, pour établir une balance d'une part entre l'azote protéique qui disparaît au cours de la protéolyse et d'autre part l'azote ammoniacal qui apparaît dans le milieu.

RESULTATS DE L'ANALYSE DE 10 SOLS DIFFERENTS AVEC LA TECHNIQUE PROPOSEE

Dans les histiogrammes représentant l'apparition des acides aminés dans le milieu de culture, les deux amino-acides les plus fréquemment rencontrés au cours de nos analyses sont représentés :

l'alanine : par des plages blanches.

la valine : par des plages noires.

Is : Intensité des taches après révélation par la *ninhydrine acétique.*

Nature du sol : humus forestier. — Humidité : 29 %

Situation géographique : col des Arres (Hte-Gne).

Prélèvement effectué le 27 février 1962 - Analyse le 7 juin 1962.

Résultats d'analyse :

Courbe de disparition de l'azote protéique :

Cette dégradation s'effectue en trois temps :

— 1er au 3e jour : début de la protéolyse ;

— 3e au 14e jour : période de latence pendant laquelle les protéines ne sont pratiquement pas dégradées ;

— 14e au 21e jour : reprise de la protéolyse et dégradation de la presque totalité des protéines.

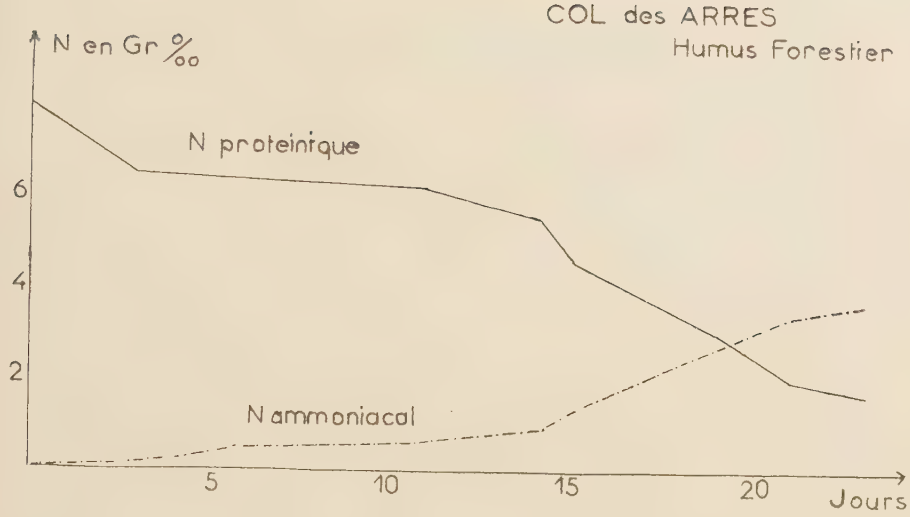
Pourcentage d'azote protéinique dégradé après 10 jours de pousse : 23 %.

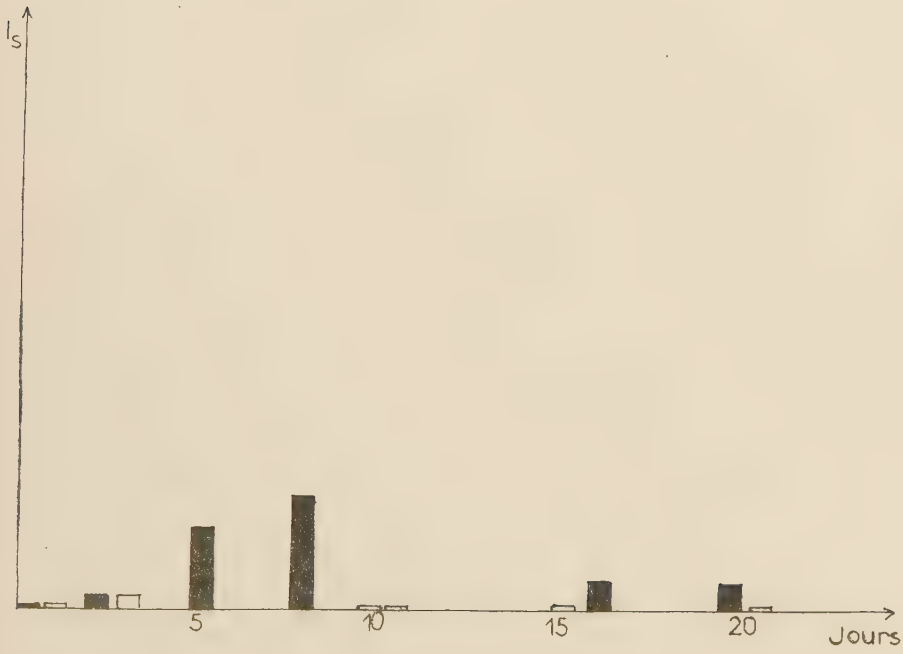
Apparition de SH2 :

T° au 2e jour : 0 ; 2e au 4e jour : + + ; 4e au 15e jour : + ; 15e au 21e jour : + + + + .

Evolution du pH :

T° 7,1 ; 2e au 4e jour : 6,9 ; 7e jour : 7,2 ; 11e jour : 7,7 ; 14e jour : 8 ; 17e jour : 7,6.


COL des ARRES
Humus Forestier
N en Gr %o
N proteinique
N ammoniacal
6
4
2
5
10
15
20
Jours


Is
5
10
15
20
Jours

Amino-acides identifiés dans le milieu de culture.

T° : après passage sur permutite et concentration, nous mettons en évidence sur le chromatogramme : *sérine alanine. valine. leucine. lysine.* en quantités très faibles.

2e jour : disparition des taches de *sérine glycocole leucine lysine.* Libération d'Alanine et de Valine dont la concentration est maxima au 8e jour d'incubation.

8e au 14e jour : pas de spot d'amino-acide visible.

14e au 21e jour : apparition de faibles quantités de Valine et de traces d'Alanine.

Apparition de l'indol.

1er au 14e jour : 0 ; 15e jour : + ; 17e au 21e jour : + + + .

Concentration du milieu en azote ammoniacal.

T° au 14e jour : concentration inférieure à 0,5 gr par litre. 14e au 21e jour : le milieu s'enrichit régulièrement en NH3 à mesure que les protéines sont dégradées : cette concentration est maxima en fin de protéolyse pour diminuer ensuite. Après 25 jours de pousse 50 % de l'azote protéique apparaissent sous forme de NH3.

Interprétation :

Trois vagues microbiennes semblent se succéder au cours de cette protéolyse. Une première vague, après avoir utilisé les acides aminés libres du milieu réalise un premier clivage de protéines : le pH reste voisin de la neu-

tralité. Les amino-acides libérés sont réutilisés aussitôt et seuls l'alanine et surtout la valine ne sont pas dégradés dès leur apparition.

A cette première attaque succède une phase de latence, la courbe de lyse protéinique reste en plateau, il n'y a pas de produits de clivage, de la neutralité le pH devient alcalin.

Reprise, le 14e jour, de la dégradation active des protéines se traduisant par :

— une évolution du pH vers la neutralité ;

— la chute de l'azote protéique ;

— l'enrichissement du milieu en N ammoniacal :

— l'apparition d'indol et un dégagement important de SH 2.

Les acides aminés n'apparaissent dans le milieu qu'en très faibles quantités, en effet la dégradation protéinique est assez lente et à mesure de leur apparition ils sont utilisés à nouveau par le microflore ammonifiante qui les désaminera. Une partie de NH 3 reste libre dans le milieu, l'autre partie est réutilisée par les bactéries hétérotrophes et autotrophes.

D'après les résultats de cette analyse, nous classons cet humus : terre de microflore protéolytique peu active (23 % des protéines dégradées après 10 jours de pousse).

Nature du sol : Terre arable ; humidité 30 %.

Situation géographique : Cameroun.

Prélèvement effectué le 15 août 1960 ; analysé le 17 mars 1962.

Résultats de l'analyse :

Courbe de disparition de l'azote protéique.

— Dès l'ensemencement et jusqu'au 3e jour de pousse se réalise un début d'attaque des protéines ;

— Du 3e au 8e jour phase de latence ;

— le 8e jour la dégradation des protéines reprend brusquement et nous constatons une lyse presque totale après 18 jours de culture.

Pourcentage d'azote protéique dégradé après 10 jours de pousse : 46 %.

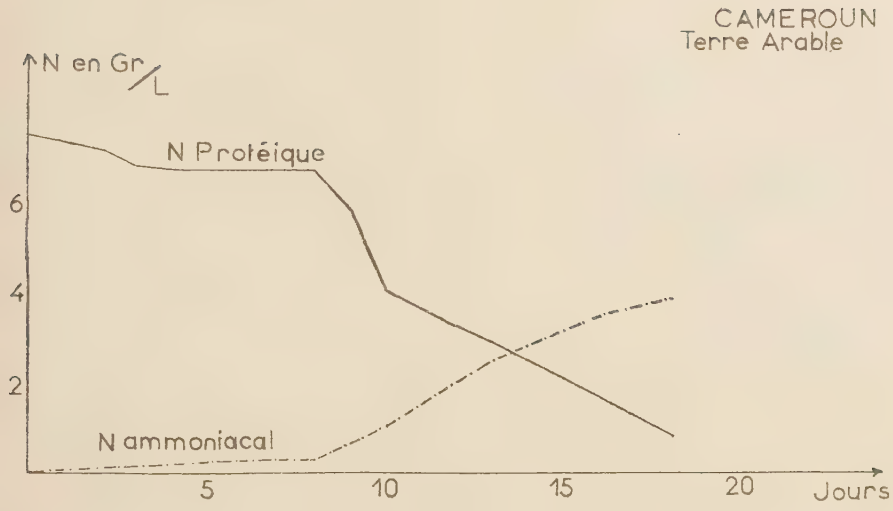
Apparition de SH2

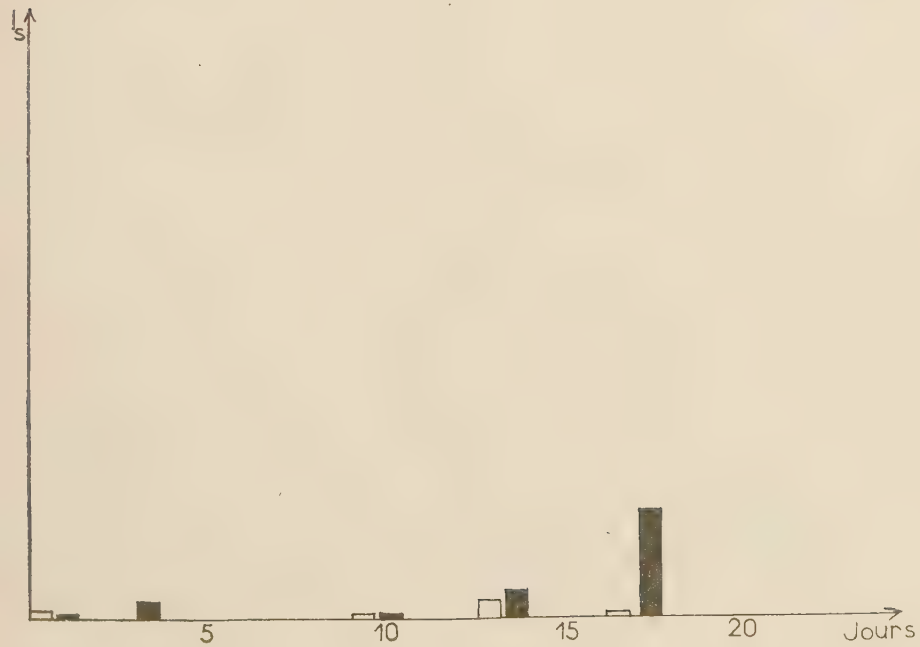
T° au 2e jour : 0 ; 3e au 7e jour : + ; 8e jour : + + ; 10e jour : + + + ;

12e au 17e jour : + + + +.

Evolution du PH.

T° : 7,1 ; 2e jour : 6,7 ; 5e jour : 7,1 ; 7e jour : 7,4 ; 9e jour : 7,6 ; 13e jour : 7,7 ; 15e jour : 7,7 ; 17e jour : 8,6.


CAMEROUN
Terre Arable
N en Gr/L
N Protéique
6
4
2
N ammoniacal
5
10
15
20
Jours


l/s
5
10
15
20
Jours

Amino-acides identifiés dans le milieu de la culture.

T° : *Sérine*, *Lysine*, *Valine*, *Glycocolle*, *Alanine*, *Leucine*, *Ac. glutamique*, en très faible quantités.

2e jour : diminution du taux de tous les amino-acides libres. seule la concentration en valine augmente légèrement.

3e jour : un seul spot de valine.

4e au 9e jour : pas d'amino-acide révélé sur le chromatogramme.

9e au 12e jour : révélation de Lysine, Alanine, Valine.

13e au 17e jour : après un maximum le 13e jour les taches de Lysine et d'Alanine disparaissent : la concentration en Valine augmente régulièrement à partir du 12e jour et est au maxima en fin de protéolyse.

Apparition de l'Indol.

1er au 7e jour : 0 : 9e jour : + : 10e jour : + + : 13e jour : + + +.

Concentration du milieu en azote ammoniacal.

T° au 8e jour. Concentration inférieure à 0,5 gr d'azote par litre : 8e au 18e jour : la teneur du milieu en NH3 augmente régulièrement. En fin de protéolyse 60 % de l'azote protéinique apparaît sous forme de NH3.

INTERPRÉTATION :

Le processus protéolytique est toujours le même. microflore de départ utilisant les amino-acides libres. légère attaque des protéines : libération de Valine réutilisée.

La phase de latence est ici plus courte que pour la terre précédente ; le pH s'alcalinise légèrement.

A cette phase de latence succède le 8e jour une protéolyse rapide. La pente de la courbe d'abord prononcée. s'infléchit après le 10e jour.

Durant cette période active le pH reste faiblement alcalin, le dégagement de SH2 est important mais de tous les amino-acides libérés. seul la Valine persiste dans le milieu de culture et nous pouvons déjà constater que cet acide aminé, s'il témoigne de la dégradation protéique. n'est pas réutilisé aussi rapidement que les autres produits de clivage.

Au cours de cette analyse, si la phase de latence est assez longue, la dégradation est ensuite rapide. L'activité de la microflore ammonifiante permet un bon enchaînement du phénomène qui se traduit par une transformation de 60 % de l'azote protéinique en azote ammoniacal.

Dégradant après 10 jours de pousse 46 % de protéines, la microflore protéolytique de la terre du Cameroun est assez active.

Nature du sol : terre arable ; humidité : 13 %.

Situation géographique : Merles (T.-G.).

Prélèvement effectué le 12 mai 1962, analysé le 26 juin 1962.

Résultats de l'analyse :

Courbe de disparition de l'azote protéique.

— légère attaque du 1er au 3^{e} jour ;

— très brève phase de latence du 3^{e} au 6^{e} jour ;

— lyse très rapide des protéines, le phénomène est terminé le 15^{e} jour.

Pourcentage d'azote protéique dégradé après 10 jours de pousse : 73 %.

Apparition du SH2.

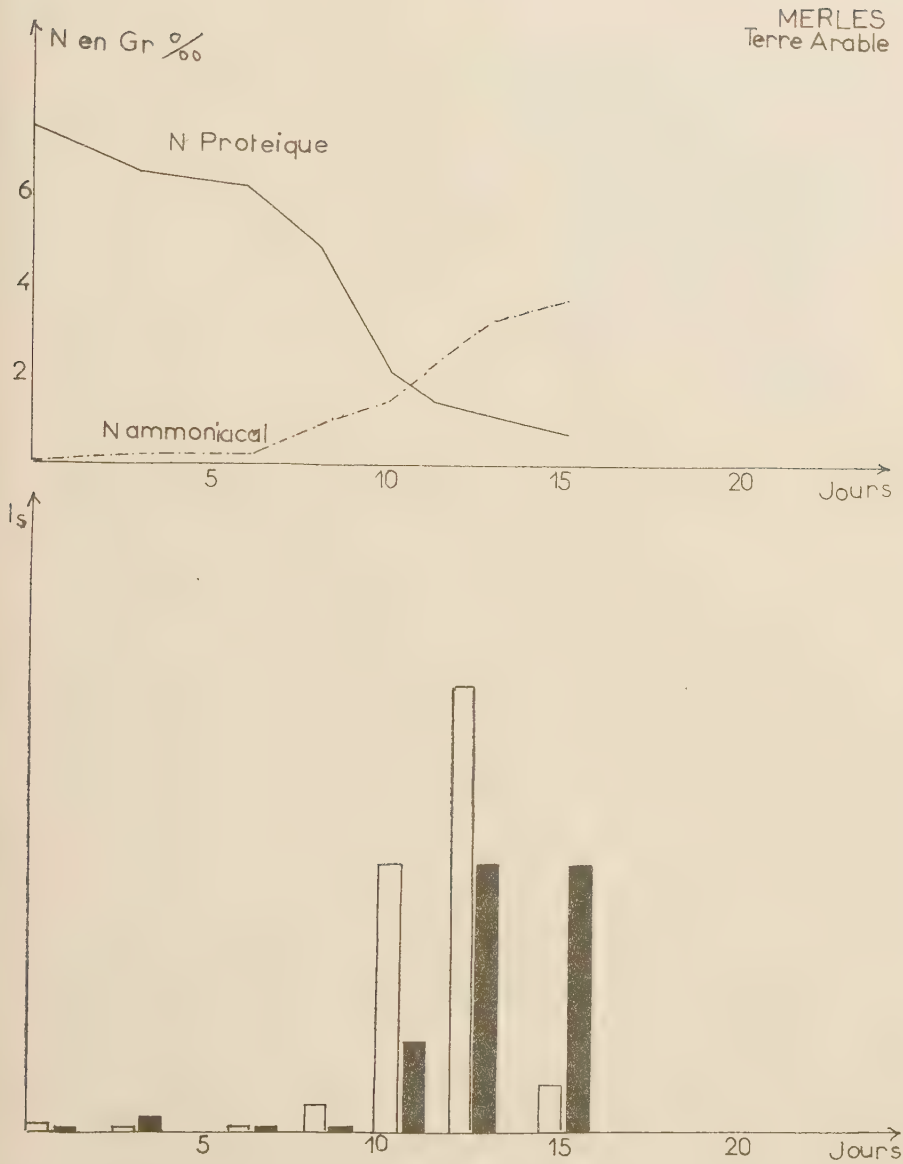
T° au 2^{e} jour : 0 ; 2^{e} au 6^{e} jour : + ; 7^{e} jour : + + ; 8^{e} jour : + + + +.

Evolution du pH.

T° : 7,1 ; 2^{e} jour : 7,2 ; 6^{e} jour : 7,3 ; 8^{e} jour : 7,5 ; 10^{e} jour : 7,6 ; 13^{e} jour : 7,8 ; 15^{e} jour : 8 ;

Amino-acides identifiés dans le milieu de culture.

T° : *Sérine, Glycocolle, Valine, Alanine, Leucine, Lysine, Ac. Glutamique.*


MERLES
Terre Arable
N en Gr %o
N Proteique
N ammoniacal
6
4
2
5
10
15
20
Jours
Is
5
10
15
20
Jours

3e au 8e jour : traces d'Alanine et de Valine.

8e jour : la concentration en Valine et Alanine augmente rapidement et est maxima le 11e jour. Nous identifions d'autre part sur le chromatogramme : Lysine, Sérine, Phényl-Alanine, Leucine, leur concentration passe aussi par un maxima le 11e jour puis diminue.

En fin de protéolyse seules Valine et Alanine sont présentes dans le milieu.

Apparition de l'Indol.

1er au 6e jour : 0 ; 8e jour : + + ; 10e jour : + + + +.

Concentration du milieu en azote ammoniacal.

T° au 6e jour : inférieure à 0,5 gr par litre.

6e au 15e jour : augmentation proportionnelle à la dégradation protéique. En fin de protéolyse 50 % de l'azote protéique dégradé apparaissent sous forme de NH3.

INTERPRÉTATION.

Utilisation d'abord des amino-acides libres, puis légère attaque des protéines : apparition puis utilisation de la Valine.

La phase de latence est ici très réduite puisqu'elle ne dure que trois jours. Le 6e jour commence une protéolyse rapide. Les acides amines libérés entre le 6e et 8e jour sont aussitôt désaminés, mais ensuite le microflore ammonifiante n'est plus capable d'utiliser rapidement les

produits de clivage, d'où accumulation dans le milieu de certains acides aminés constitutifs des protéines.

Ceux dont la concentration est la plus importante sont par ordre décroissant : Alanine, Valine, Leucine, Nor-Valine, Phényl-Alanine, Lysine, Sérine ; nous constatons déjà l'utilisation préférentielle de ces amino-acides par la flore microbienne d'ammonification.

En fin de protéolyse tous ces amino-acides ont disparu du milieu de culture sauf l'Alanine et la Valine dont le taux reste élevé.

La terre de Merles est douée d'une activité protéolytique importante ; elle dégrade en 10 jours 73 % des protéines totales.

Nature du sol : humus forestier ; humidité : 11 %.

Situation géographique : forêt de la Grésigne.

Prélèvement effectué le 1er juillet 1962, analyse le 9 juillet 1962.

Résultats de l'analyse :

Courbe de disparition de l'azote protéique.

— T° au 8e jour, très légère diminution du taux des protéines.

8e jour, attaque brutale des protéines ; la courbe présente une forte pente, la lyse se ralentit ensuite : phénomène terminé le 17e jour.

Azote protéique dégradé après 10 jours de pousse : 49 %.

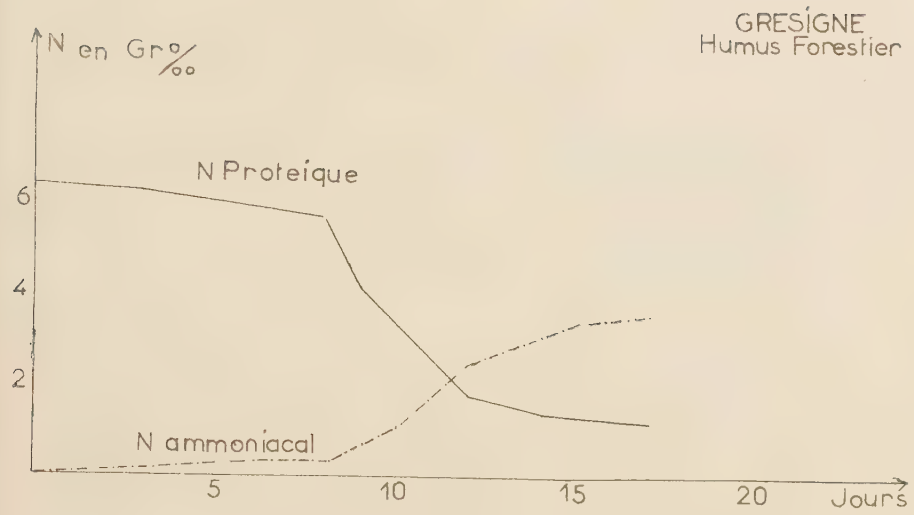
Apparition de SH2.

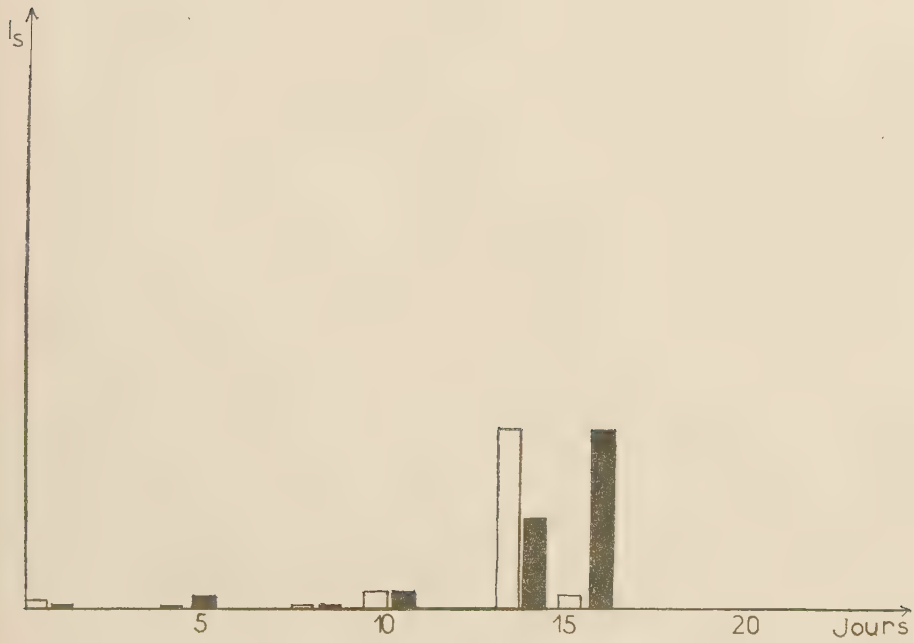
T° au 2e jour : 0 ; 3e jour : + ; 6e jour : + ; 9e jour : + + ;

10e jour : + + + +.

Evolution du pH.

T° : 7,2 ; 3e jour : 7,2 ; 5e jour : 7,2 ; 7e jour : 7,4 ; 10e jour : 7,5 ; 14e jour : 7,7 ; 17e jour : 8,3.


GRESIGNE
Humus Forestier
N en Gr°/°°
N Proteique
N ammoniacal
6
4
2
5
10
15
20
Jours


Is
5
10
15
20
Jours

Amino-acides identifiés dans le milieu de culture.

T° *Sérine, Glycocolle, Alanine, Valine, Leucine, Lysine.*

L'utilisation de ces amino-acides libres est complète le 3^{e} jour.

Au 10^{e} jour, mise en évidence de Valine, Alanine, Leucine, Lysine, Phényl-Alanine, Sérine. Leur concentration augmente et est à son maxima après 14 jours de pousse. L'estimation quantitative d'après l'intensité des taches révélées à la ninhydrine acétique nous permet d'en établir une classification par ordre de concentrations décroissantes : Alanine, Valine, Leucine, Nor-Valine, Phényl-Alanine, Lysine.

Quinzième jour : seule subsiste la tache de Valine dont l'intensité restera inchangée jusqu'à la fin de la protéolyse.

Apparition de l'Indol.

T° au 8^{e} jour : 0 ; 10^{e} jour : + ; 13^{e} jour : + + +.

Concentration du milieu en azote ammoniacal.

— T° au 8^{e} jour, concentration inférieure à 0,5 gr par litre.

— 8^{e} au 17^{e} jour, augmentation régulière, maximum le 17^{e} jour : 63 % de l'azote protéique dégradé est alors retrouvé sous forme de NH3.

Interprétation :

Nous assistons ici encore à l'utilisation préférentielle des petites molécules libres, puis à un début de clivage des protéines avec apparition de Valine, la protéolyse active débute le 8^{e} jour de culture, elle est accélérée jusqu'au 12^{e} jour puis se ralentit.

Les produits d'hydrolyse d'abord réutilisés s'accumulent ensuite : cependant leur concentration dans le milieu n'est jamais très importante et leur dégradation assez rapide.

Dégradant après 10 jours de pousse 19 % de l'azote protéique, cet humus forestier apparaît donc doué d'une assez bonne activité protéolytique.

Nature du sol : Prairie ; humidité : 13 %.

Situation Géographique : Lacq (B.-P.).

Terre soumise aux vapeurs de SO2.

Prélèvement effectué le 20 octobre 1961, analysé le 29 juin 1962.

Résultats de l'analyse :

Courbe de disparition de l'azote protéique.

T° au 6e jour : légère dégradation protéique.

6e au 12e jour : période de protéolyse active, la concentration du milieu en azote protéique est devenue inférieure à 1 gr par litre après 13 jours d'incubation.

Azote protéique dégradé après 10 jours de pousse : 43 %.

Apparition de SH2.

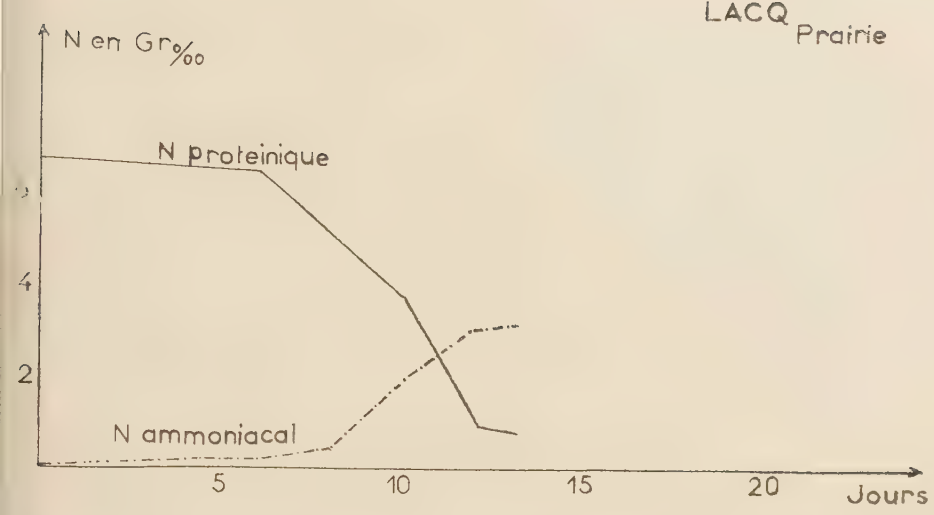
T° au 2e jour : 0 ; 3e au 6e jour : + ; 7e jour : + + ; 9e au 13e jour : + + + .

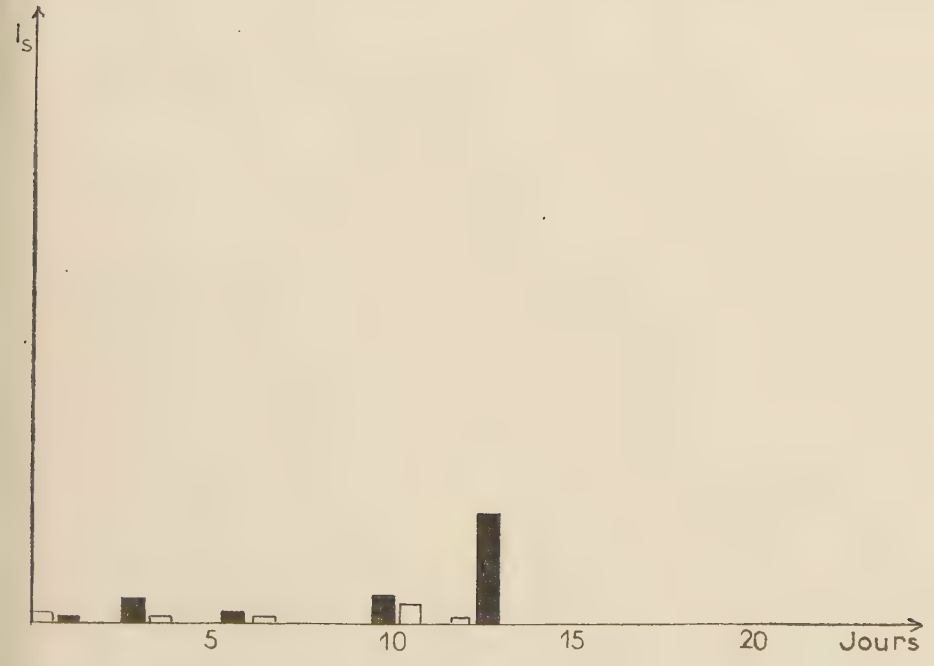
Evolution du pH.

T° : 7,1 ; 4e jour : 7,1 ; 6e jour : 7,8 ; 7e jour : 7,6 ; 11e jour : 7,7 ; 13e jour : 8.

Amino-acides identifiés dans le milieu de culture.

T° : *Sérine. Glycocolle. Alanine. Valine. Leucine. Lysine.*


LACQ Prairie
N en Gr‰
N proteinique
4
2
N ammoniacal
5
10
15
20
Jours


I_S
5
10
15
20
Jours

4e jour : Valine et Alanine sont révélées sur le chromatogramme.

5e au 7e jour : pas de libération d'amino-acide.

Huitième jour : Présence de Lysine, Thréonine, Alanine, Valine. Phényl Alanine. Leucine : en très faibles quantités. Leur concentration est maxima après 10 jours de culture. seule la tache de Valine augmente d'intensité jusqu'au 13e jour : elle reste cependant assez faible.

Apparition de l'Indol :

Premier au 8e jour : 0 ; 9e jour : + ; 10e au 13e jour : + + .

Concentration du milieu en azote ammoniacal.

Deux phases principales :

— 1er au 6e jour, concentration inférieure à 0,5 gr par litre ;

— 6e au 12e jour, augmentation régulière du taux d'ammoniac, plateau le 13e jour. Après 12 jours de pousse : 53 % de l'azote protéique apparaissent sous forme de NH3.

Interprétation :

Du 1er au 6e jour d'incubation la lyse protéique est faible, elle s'accélère ensuite pour être pratiquement terminée au 12e jour. Les amino-acides restent toujours en faible concentration dans le milieu. seule la Valine s'ac-

cumule en fin du phénomène. L'activité protéolytique de cette terre est assez faible, la dégradation des protéines totales n'étant que de 43 % après 10 jours de pousse ; cette lyse peu active pour une terre de prairie peut être expliquée par le rôle néfaste joué par les émanations des usines sur la microflore du sol.

Nature du sol : tourbe, humidité : 40 %.

Situation géographique : Orédon - Cirque de l'Estaragne - Massif du Néouvielle (H.-P.).

Prélèvement effectué le 13 octobre 1961. Analysé le 17 juillet 1962.

Résultats de l'analyse :

Courbe de disparition de l'azote protéique.

— Attaque légère du 1er au 6e jour d'incubation.

— Chute rapide du 6e au 11e jour.

— Ralentissement de la protéolyse et dégradation terminée après 15 jours d'incubation.

Azote protéique dégradé après 10 jours de pousse : 70 %.

Apparition de SH2.

T° au 3e jour : 0 ; 2e au 6e jour : - ; 7 jour : + + ; 8e jour : + + +.

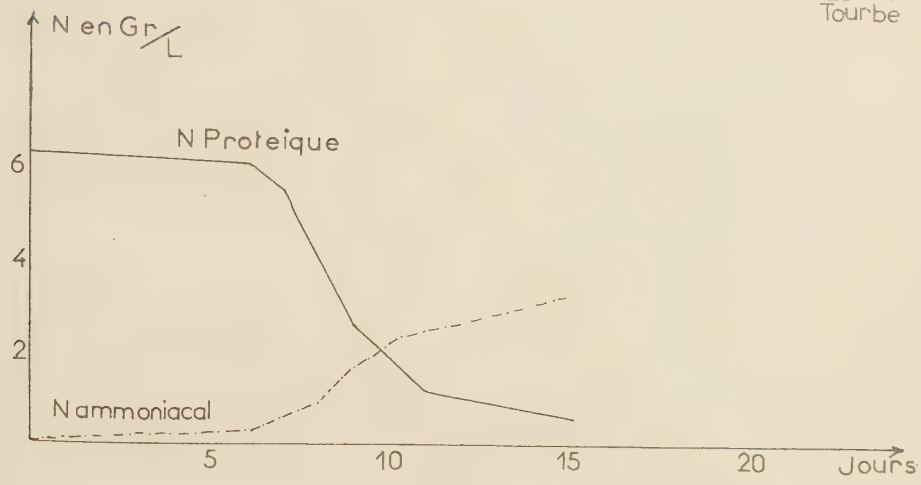
Evolution du pH.

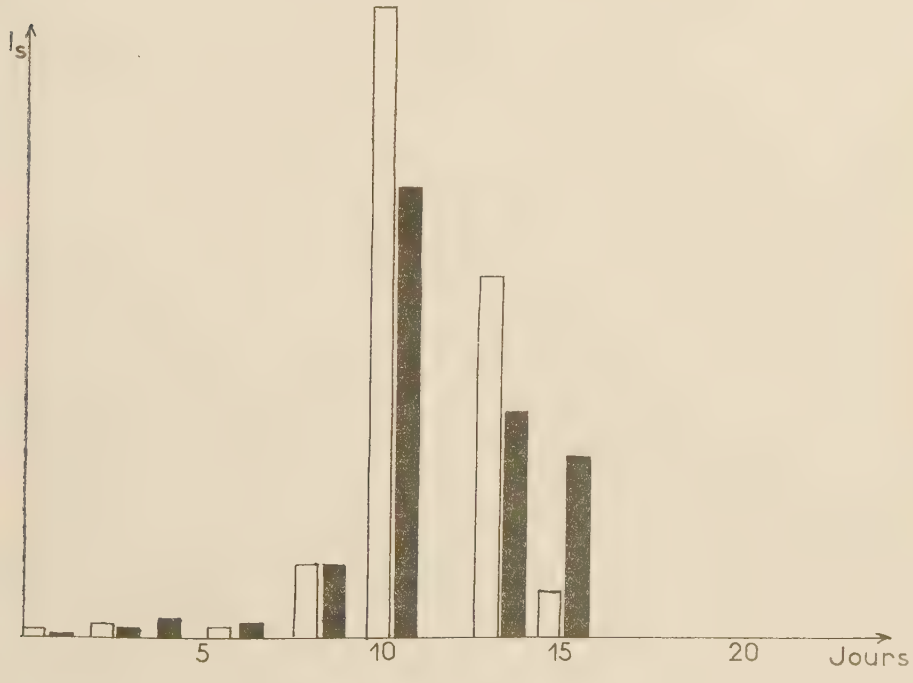
T° 7,2 ; 2e au 4e jour : 7,2 ; 7e au 10e jour : 7,4 ; 11e jour : 7,5 ; 13e jour : 7,8 ; 15e jour : 8.

Amino-acides identifiés dans le milieu de culture.

T° *Sérine, Glycocolle, Leucine, Lysine, Alanine, Valine.*

OREDON
Tourbe





1er au 6e jour : seuls subsistent les spots de Valine et d'Alanine. A partir du 6e jour nous identifions : Valine. Alanine. Leucine. Lysine. Sérine. Leur concentration augmente en de fortes proportions et le 8e jour nous identifions en plus des acides aminés précédemment cités. du Glycocolle Ac., Glutamique, Tyrosine.

La concentration de ces différents acides aminés est maximum au 10e jour de protéolyse ; le 11e jour Tyrosine, Ac. Glutamique et Glycocolle disparaissent. la concentration en Lysine et en Sérine diminue.

13e jour : nous ne retrouvons que : Valine, Alanine. Leucine, Phényl-Alanine.

15e jour : seul subsiste un spot de Valine dont l'intensité diminue régulièrement et de faibles quantités d'Alanine et de Leucine.

Apparition de l'Indol.

T° au 6e jour : 0 ; 7e jour : + ; 10e : + + ; 13e : + + + +.

Concentration du milieu en azote ammoniacal.

Jusqu'au 6e jour : concentration inférieure à 0,5 gr par litre ; 6e au 15e jour : augmentation de l'azote ammoniacal au fur et à mesure de la dégradation protéique.

En fin de protéolyse 57 % de l'azote protéique apparaissent sous forme de NH3.

Interprétation.

L'allure de la courbe est classique, la dégradation active débute ici le 6e jour, mais la terre d'Orédon se différencie de celles analysées précédemment car nous retrouvons dans le milieu la presque totalité des acides aminés constitutifs des protéines. Leur réutilisation est rapide pour certains : Tyrosine. A. Glutamique, tardive pour d'autres : Valine. Nous constatons donc, pour ce sol d'Orédon une dissociation entre la dégradation des protéines et la réutilisation des produits de clivage. La terre d'Orédon est cependant très protéolytique, elle dégrade en 10 jours 70 % de l'azote protéinique.

Nature du sol : Causse.

Situation géographique : Cordes (Tarn) ; Humidité : 8 %.

Prélèvement effectué le 1er septembre 1962 : Analysé le 15-9-1962.

Résultats de l'analyse.

Courbe de disparition de l'azote protéique.

1er au 8e jour : Faible diminution du taux des protéines. La dégradation s'accentue ensuite mais reste assez lente.

Pourcentage protéique dégradé après 10 jours de pousse : 22 %.

Apparition de SH2.

T° au 2e jour : 0 ; 3e jour : + ; 6e jour : + + ; 11e jour : + + +.

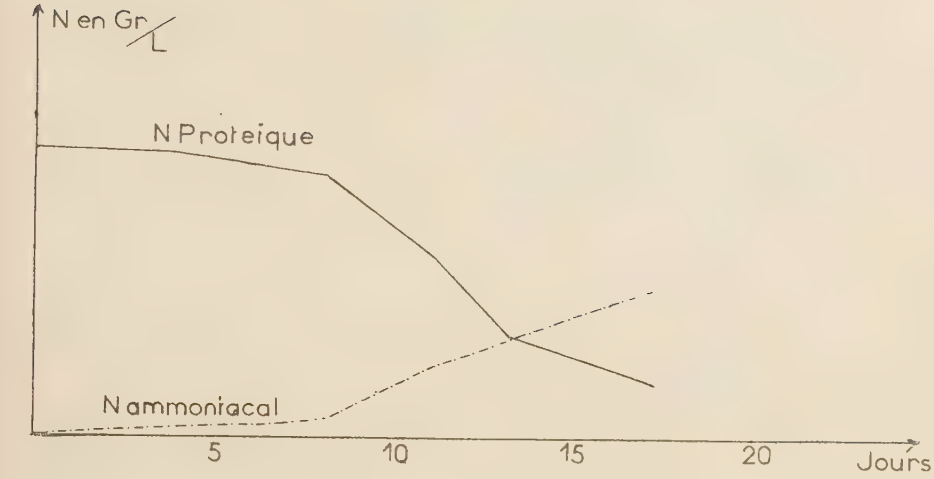
Evolution du pH :

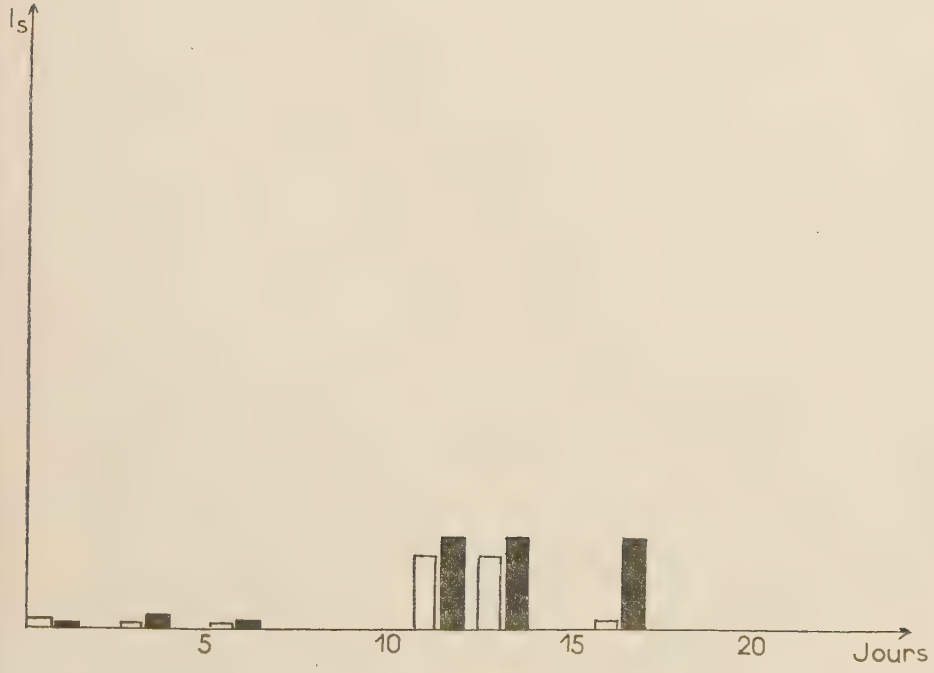
T° 7,2 ; 3e jour : 7,2 ; 6e jour : 7,4 ; 11e jour : 7,8 ; 15e jour : 8.

Amino-acides identifiés dans le milieu de culture.

T° : *Sérine, Glycocolle, Alanine, Valine, Leucine, Lysine.*

CAUSSE


N en Gr/L
N Proteique
N ammoniacal
5
10
15
20
Jours


Is
5
10
15
20
Jours

2e jour : Un spot de Valine, traces d'Alanine ; la concentration en Valine est maximum le 3e jour puis diminue ; elle reste très faible jusqu'au 8e jour.

9e jour : Valine et Alanine sont révélées sur le chromatogramme. L'intensité de leur spot augmente régulièrement et est maximum après 11 jours de pousse.

11e au 14e jour : La teneur du milieu en Alanine et en Valine ne varie pas.

15e jour : La concentration en Alanine diminue ; le taux de Valine reste constant.

Apparition de l'Indol :

T° au 8e jour : 0 ; 8e au 11e jour : + ; 11e au 17e jour : + +.

Concentration du milieu en azote ammoniacal.

T° au 8e jour : concentration inférieure à 0,5 gr par litre ; 8e au 17e jour : augmentation régulière de l'azote ammoniacal ; 60 % de l'azote protéique dégradé est alors sous forme ammoniacale.

Interprétation.

La protéolyse est longue à s'effectuer ; la pente de la courbe de disparition protéique ne s'accentue qu'après 8 jours d'incubation : mais l'activité protéolytique de cette terre reste faible, du 8e au 17e jour de culture la lyse protéique est lente : 22 % seulement des protéines sont dégradées après 10 jours de culture. Seules Alanine et Valine apparaissent dans le milieu au cours de cette analyse, la réutilisation de l'Alanine étant presque complète en fin de protéolyse.

Nature du sol : humus forestier ; Humidité : 15 %.

Situation géographique : Forêt de Bouconnes (Hte-Garonne).

Prélèvement effectué le 24 mai 1962 ; Analysé le 7 juin 62.

Résultats de l'analyse :

Courbe de disparition de l'azote protéique.

2 phases principales ; 1er au 6^{e} jour : légère dégradation protéique ; 6^{e} au 11^{e} jour : Protéolyse active, disparition au 11^{e} jour de la presque totalité des protéines ; celles-ci se poursuit très ralentie jusqu'au 18^{e} jour d'incubation.

Pourcentage protéique dégradé après 10 jours de pousse : 70 %.

Apparition de SH2.

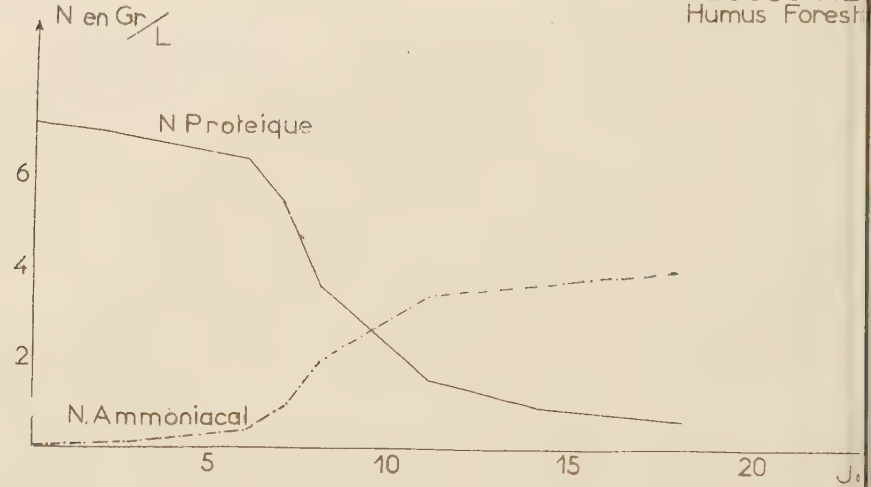
T° au 2^{e} jour : 0 : 4^{e} jour : + : 6^{e} jour : + : 7^{e} au 15^{e} jour : + + + +.

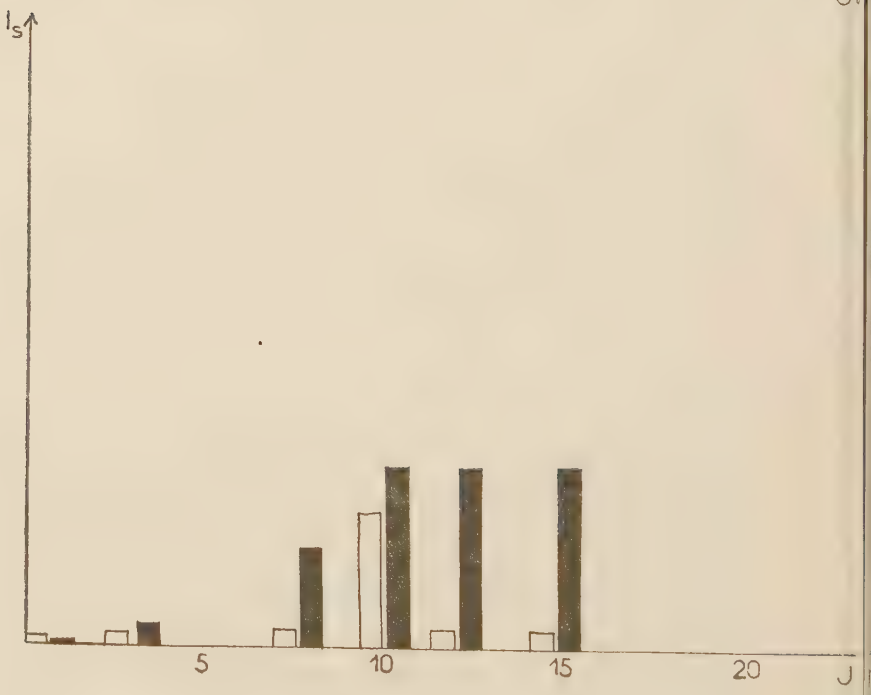
Evolution du pH.

T° : 7,1 : 2^{e} jour : 6,9 ; 3^{e} jour : 6,8 ; 6^{e} jour : 7 ; 7^{e} jour : 7,2 ; 11^{e} jour : 7,4 ; 14^{e} jour : 7,7 ; 18^{e} jour : 8,2.

Amino-acides identifiés dans le milieu de culture.

T° : *Sérine, Glycocolle, Alanine, Valine, Leucine, Lysine.*


N en Gr/L
N Proteique
6
4
2
N. Ammoniacal
5
10
15
20
J.


I_s
5
10
15
20
J

2e jour : Alanine-Valine.

7e jour : Identification de Lysine, Phényl Alanine, B Alanine, Leucine, Alanine, Valine. Leur concentration dans le milieu est à son maximum le 11e jour.

12e jour : La tache d'alanine a fortement diminué ; la teneur en Valine est constante et le restera jusqu'au 18e jour.

Apparition de l'Indol :

T° au 6e jour : 0 ; 7e jour : + ; 8e jour : + + ; 12e jour : + + +.

Concentration du milieu en azote ammoniacal.

T° au 6e jour : Concentration inférieure à 0.5 gr par litre : 6e au 18e jour : enrichissement progressif du milieu en NH3 ; après 18 jours de pousse 61 % de l'azote protéique sont passés à l'état de NH3.

Interprétation.

La dégradation des protéines est rapide ; elle s'amplifie après le 6e jour d'incubation. Les amino-acides apparaissent dans le milieu du 6e au 11e jour, leur concentration n'est jamais très importante et leur réutilisation rapide.

Cet humus forestier a donc une activité protéolytique importante, les produits de clivage ne s'accumulent pas dans le milieu et seule la lyse protéique très rapide permet leur mise en évidence.

Nature du sol : Prairie.

Situation géographique : Col des Arres (Hte-Gne) ; Humidité : 4 %.

Prélèvement effectué le 13 juillet 1962 ; Analysé le 17-7-62.

Résultats de l'analyse :

Courbe de disparition de l'azote protéique.

T° au 7e jour : très faible lyse protéique ; 8e au 12e jour : Protéolyse très rapide, dégradation de 80 % des protéines totales dont le taux reste constant après 18 jours de culture.

Protéines dégradées après 10 jours de pousse : 34 %.

Apparition de SH2.

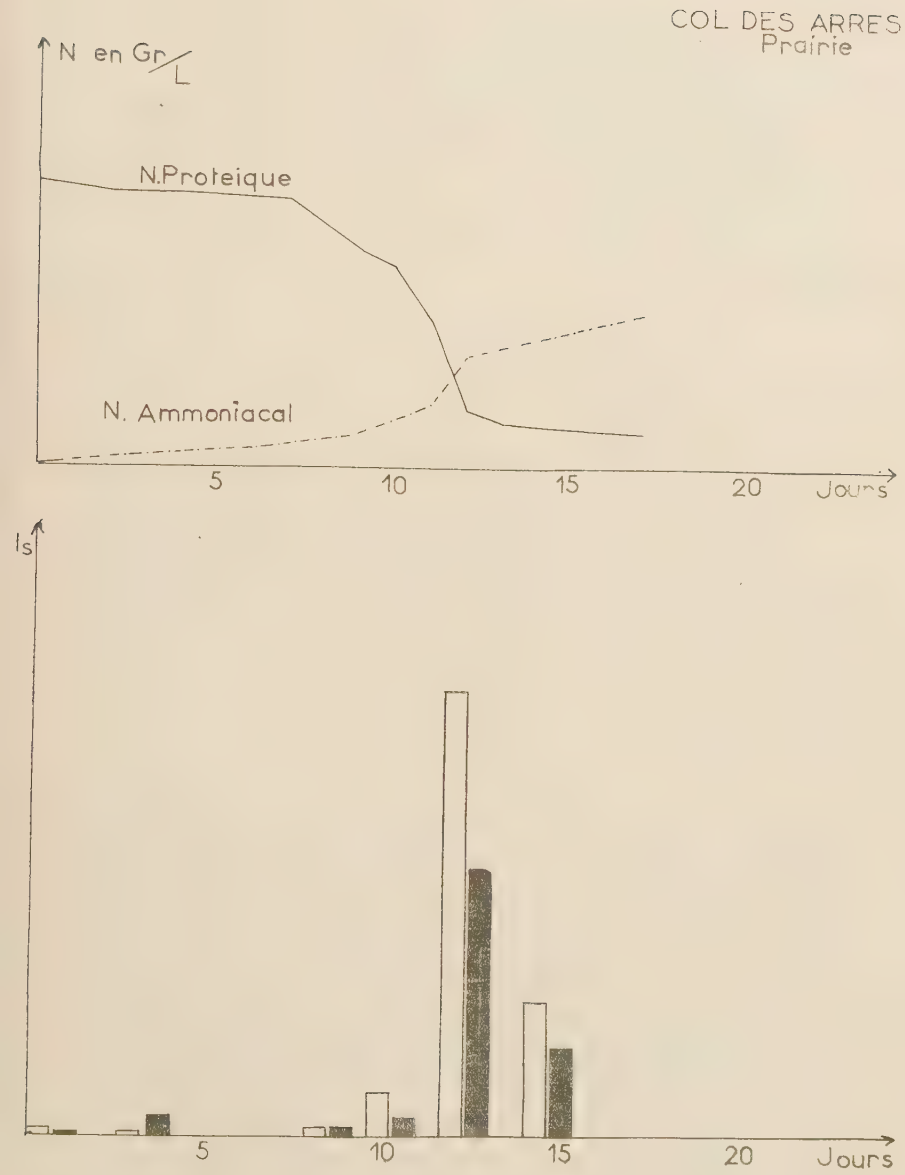
T° au 2e jour : 0 ; 3e au 8e jour : + ; 9e jour : + + + ; 10e jour : + + + +

Evolution du pH.

T° : 7,2 ; 2e jour : 7 ; 4e jour : 7,1 ; 7e jour : 8 ; 9e jour : 7,4 ; 11e jour : 7,5 ; 13e jour : 7,4 ; 15e jour : 7,5.

Amino-acides identifiés dans le milieu de culture.

T° : *Sérine, Glycocolle, Leucine, Lysine, Alanine, Valine.*


COL DES ARRES
Prairie
N en Gr/L
N.Proteique
N. Ammoniacal
5
10
15
20
Jours
Is
5
10
15
20
Jours

2e au 10e jour : Alanine-Valine dont la concentration est maxima le 4e jour d'incubation.

10e jour : Leucine, Phényl Alanine, Valine, Alanine. Maximum le 12e jour.

13e jour : les taches diminuent simultanément d'intensité et la teneur du milieu en amino-acides est faible en fin de protéolyse.

Apparition de l'Indol :

T° au 8e jour : 0 ; 9e jour : + : 11e jour : + +.

Concentration du milieu en azote ammoniacal.

T° au 7e jour : concentration inférieure à 0,5 gr par litre ; 8e au 12e jour : augmentation très rapide : 12e au 17e jour : élévation plus lente du taux d'ammoniac, après 17 jours de pousse 53 % de l'azote protéique sont passés sous forme ammoniacale.

Interprétation.

La courbe de protéolyse présente une phase de latence importante, mais une fois amorcée, la dégradation est très rapide. Cet allongement du temps de latence peut être dû aux mauvaises conditions climatiques au moment du prélèvement : celui-ci a été effectué au mois de juillet et la terre ne contenait alors que 4 % d'humidité ; la libération abondante des amino-acides en pleine phase protéolytique découle de la dégradation « explosive » des protéines, leur utilisation est ensuite rapide et se traduit, entre les 12e et 17e jours par une libération de NH3 assez importante.

Nature du sol : Terre à truffes ; Humidité : 5 %.

Situation géographique : Cordes (Tarn).

Prélèvement effectué le 1er septembre 1962 ; Analysé le 15-9-62.

Résultats de l'analyse :

Courbe de disparition de l'azote protéique.

Du 1er au 3e jour : Lyse de 15 % des protéines ; 3 au 4e jour : Pas de dégradation protéique : 4e jour : reprise de la protéolyse, N protéique diminue régulièrement jusqu'à un minima le 18e jour.

Azote protéique dégradé après 10 jours de pousse : 68 %.

Apparition de SH2.

T° au 2e jour : 0 ; 3e jour : + ; 4e jour : + + ; 6e jour : + + + ; 8e jour : + + +.

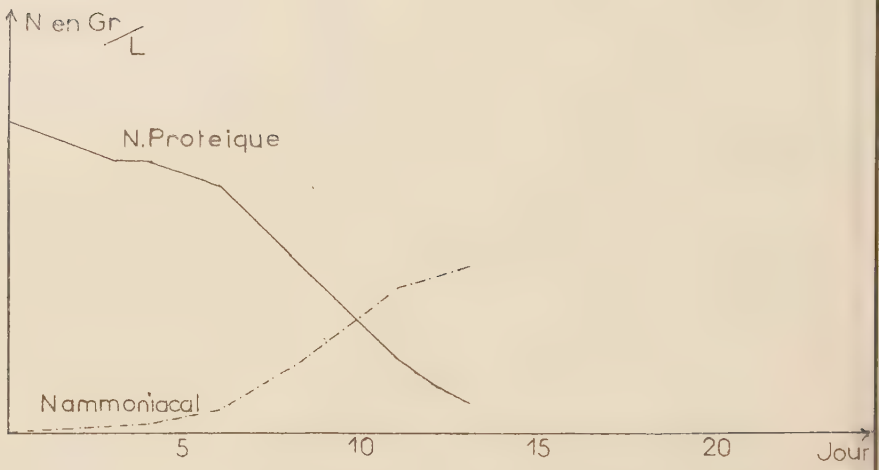
Evolution du pH.

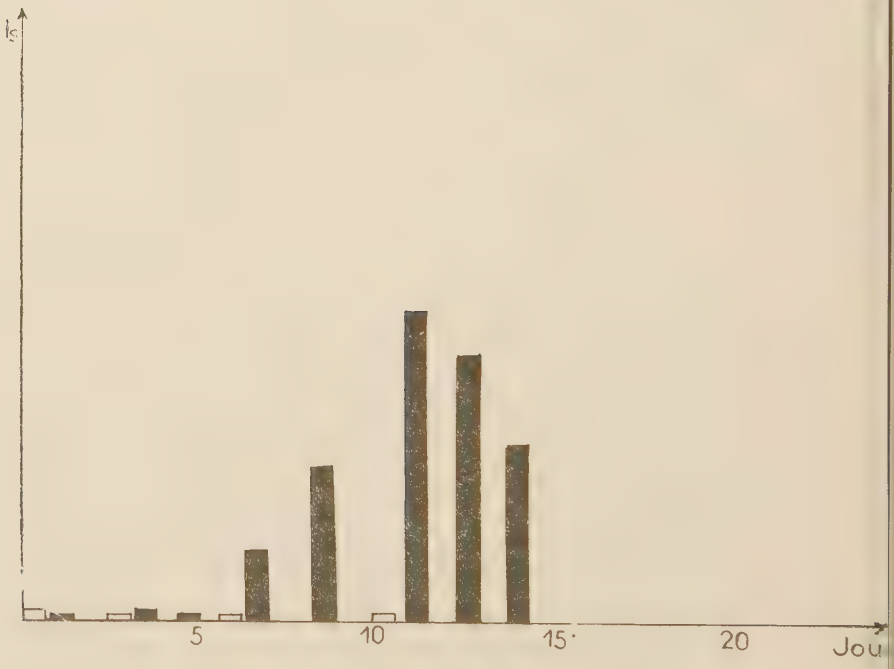
T° : 7,2 ; 3e jour : 7,2 ; 6e jour : 7,4 ; 11e jour : 7,8 ; 13e jour : 8.

Amino-acides identifiés dans le milieu de culture.

T° : *Sérine. Alanine. Valine. Leucine. Lysine. Glycocolle.*

TERRE A TRUFFES





2e jour : Disparition de tous les spots ; seule la Valine persiste, sa concentration reste faible jusqu'au 4e jour, elle augmente ensuite très rapidement et est à son maximum après 11 jours d'incubation ; elle est ensuite réutilisée, mais son taux reste important à la fin du phénomène.

Apparition de l'Indol :

1er au 6e jour : 0 ; 8e jour : + ; 10e jour : + +.

Concentration du milieu en azote ammoniacal.

Faible du 1er au 6e jour de pousse ; augmentation régulière du 6e au 13e jour, en fin de protéolyse. 57 % de l'azote protéique dégradé se retrouvent sous forme de NH3.

Interprétation.

Cette terre qui possède un pouvoir protéolytique important (68 % des protéines dégradées au 10e jour) transforme aussi très rapidement les produits de dégradation ; nous ne retrouvons en effet dans le milieu même en pleine phase protéolytique que de très faibles quantités d'amino-acides libres ; l'accumulation de la Valine est suivie de sa réutilisation partielle lorsque les produits de clivage sont libérés moins abondamment.

DISCUSSION

Cette étude portant sur dix échantillons de sol pédologiquement différents permet, nous semble-t-il, de mieux analyser le phénomène biologique qu'est la protéolyse et de tirer de nos analyses des conclusions générales.

Il est certain que la dégradation microbienne des protéines au sein du milieu sol, est un phénomène organisé. Nous retrouvons cette organisation dans nos conditions expérimentales. En effet, lorsque la microflore totale d'un sol est mise en contact avec le milieu plasma-extrait de terre, on assiste à des phases biochimiques successives, qui s'accompagnent d'ailleurs comme nous le verrons ultérieurement de modifications significatives de la microflore, et qui rappellent très exactement les phénomènes qui se déroulent au sein même du sol [20]. C'est assez dire que la méthode utilisée est biologique et qu'elle permet de reproduire dans les conditions du laboratoire, l'image fidèle du phénomène naturel.

Le plasma qui sert de milieu de base à nos analyses permet, autant que possible, d'utiliser un substrat protéique comparable à celui qui peut exister dans les milieux naturels. Dans le sol en effet, les protéines sont

toujours associées à des éléments organiques divers : substances glucidiques et composés azotés qui vont jouer un rôle dans la préparation de la protéolyse.

Dans les heures ou jours qui suivent l'ensemencement du milieu plasma-extrait de terre avec un type donné de sol, on assiste à l'utilisation immédiate des aliments énergétiques hydrate de C (glucose) et amino-acides. La protéolyse ne s'instaure pas immédiatement ou elle est très discutée au départ et il existe en fait une *phase de latence* toujours présente quelle que soit la nature du sol.

L'importance dans le temps de cette phase de latence est en fonction inverse de l'activité de la microflore zymogène protéolytique : (une terre hautement active aura une phase de latence particulièrement courte). Elle permet donc d'apprécier théoriquement non seulement l'importance quantitative de la microflore à un moment donné, mais aussi son état physiologique. On constate en effet que la phase de latence est fortement allongée dans tous les cas où la microflore était placée au moment du prélèvement dans des conditions physiologiques difficiles : c'est le cas par exemple d'un sol de haute montagne qui peut demeurer pendant un long temps sous la neige et à une température voisine de 0°.

En reproduisant artificiellement au laboratoire, à l'aide d'une chambre de climatisation, des conditions climatiques difficiles au niveau d'un sol donné, nous avons pu reproduire à volonté ces modifications d'activité de la microflore (21).

Quant à sa signification, la phase de latence correspond à une préparation du substrat à la protéolyse et surtout à une multiplication de bactéries protéolytiques et donc à une concentration de leurs systèmes enzymatiques.

La protéolyse proprement dite suit cette phase de latence. Elle est très importante mais la pente de la courbe de disparition des protéines est plus ou moins forte selon la nature du sol étudié. La valeur de cette pente peut donc conduire à une bonne estimation de *l'activité de la microflore* protéolytique proprement dite.

Plus simplement nous proposons de mesurer le pourcentage de protéines dégradées au bout de 10 jours d'incubation. La valeur de ce pourcentage est évidemment fonction du temps de latence et de l'utilisation plus importante du substrat. et elle montre des différences significatives d'un sol à un autre.

Indépendamment de la disparition de protéines. l'apparition des produits de clivage est un excellent test qui permet de préciser très exactement le début des phénomènes. Si la protéolyse est très rapide. la libération des amino-acides est brutale et même si leur réutilisation par la microflore est active, ils apparaîtront à un moment donné, en grande quantité dans le milieu. Si au contraire la protéolyse est lente, les amino-acides vont être utilisés dès leur apparition et leur concentration dans le milieu restera toujours faible.

Néanmoins, l'interprétation de ce phénomène n'est pas toujours aussi simple. Si nous comparons, en effet les résultats de deux sols différents : une tourbe (Oredon)

et un humus forestier (Bouconnes), nous trouvons qu'au dixième jour de culture, la même proportion de protéines est dégradée, que les deux courbes de disparition de l'azote protéique sont semblables mais que la quantité d'amino-acides libres présents dans le milieu est beaucoup plus importante dans le cas de la tourbe, leur réutilisation est donc moins rapide. A activité protéolytique égale la microflore ammonifiante du sol d'Oredon est moins active que celle de l'humus forestier.

Nous pensons donc que protéolyse et ammonification (c'est-à-dire utilisation des composés de dégradations) ne doivent pas être confondus et étudiés dans un même système expérimental. Si la microflore secondaire de transformation des amino-acides ou microflore ammonifiante est étroitement liée à la microflore protéolytique, elle ne possède pas forcément la même activité que celle-ci. La mesure de l'ammonification ne permet donc pas d'apprécier avec exactitude l'activité protéolytique de la microflore d'un sol donné.

L'accumulation dans le milieu des acides aminés libérés par le phénomène de protéolyse ne se fait pas au hasard. L'importance qualitative et quantitative de chacun d'entre eux varie avec chaque sol. Leur réutilisation dépend de la nature de la microflore du sol. Nous pouvons ainsi distinguer :

I) Amino-acides n'apparaissant que très rarement dans le milieu donc utilisés préférentiellement : Tyrosine, Ac. Glutamique, A Aspartique.

II) Amino-acides d'apparition plus précoce et d'utilisation plus lente : Thréonine, Sérine, Lysine.

III) Amino acides apparaissant en faibles quantités dans le milieu pour toutes les terres de bonne activité protéolytique : Leucine. B. Alanine. Phényl-Alanine.

IV) Aminoacides toujours identifiés au cours de nos analyses : Alanine. Valine. La Valine étant pour toutes les terres l'acide amine dont l'accumulation dans le milieu est la plus importante.

Cette phase de protéolyse active dont nous venons d'exposer le déroulement se réalise toujours en pH neutre ou légèrement alcalin, celui-ci devenant franchement alcalin en fin de phénomène. Pour toutes nos analyses, 50 à 60 % de l'azote protéinique dégradé apparaissent en fin de protéolyse sous forme de NH3.

Nous avons estimé, d'après notre mode opératoire, l'activité protéolytique de nos sols et nous avons, pour certains d'entre eux, comparé leur activité protéolytique et leur activité gélatinolytique. Nous avons obtenu des résultats sensiblement identiques ; ainsi, la terre arable de Merles qui dégrade 73 % des protéines en 10 jours est active à la dilution 10^{-5} au 5e jour d'incubation. Mais nous avons aussi observé certaines discordances : ainsi, la terre d'Orédon de pouvoir protéolytique élevé mais dont les produits de clivage sont très mal utilisés possède une activité gélatinolytique faible (2 au 5e jour). Cette contradiction tient peut-être au fait suivant : la gélatine n'est pas une protéine vraie mais un premier produit de clivage ; l'activité gélatinolytique semble donc correspondre davantage à la vitesse d'utilisation des premiers produits de dégradation qu'à la lyse des grosses molécules protéiniques.

Nous pensons donc qu'il est difficile, par un simple dosage de protéines ou par une étude de l'activité gélatinolytique, d'établir une classification des sols en fonction de leur pouvoir protéolytique. Nos différents dosages démontrent que chaque terre a sa « personnalité » et la notion essentielle qui se dégage de l'étude de cette protéolyse *in vitro* est celle d'un phénomène organisé.

La technique d'étude que nous avons utilisée permet précisément d'étudier biologiquement ce phénomène et son dynamisme propre. Elle permet aussi de situer chronologiquement les différentes phases de la dégradation et donc d'étudier pour chacune d'entre elles, la microflore en cause.

C'est ce que l'étude bactériologique sommaire que nous présentons maintenant va nous permettre de mettre en évidence.

ETUDE DE LA MICROFLORE

L'étude de la microflore tellurique responsable de la dégradation des protéines a fait l'objet de nombreux travaux dont les conclusions ne sont pas toujours identiques.

Remarquons tout d'abord que les techniques utilisées dans l'isolement des espèces microbiennes responsables du phénomène sont assez dissemblables. Les modifications portent sur la composition du milieu et sur la nature du substrat. Elles provoquent évidemment la révélation d'espèces différentes et entraînent des conclusions dissemblables.

C'est, d'autre part, la microflore ammonifiante qui a été surtout étudiée.

Pour WINOGRASKY S. [18] les expériences réalisées en culture pure sont dénuées de toute valeur pour expliquer ce qui se passe dans le sol ou les phénomènes de synergie et de compétition jouent un rôle essentiel ; cet auteur a réalisé son étude microbiologique en ensemençant un substrat de silico-gel imprégné avec une solution de peptone à l'aide de grains de terre. Il trouve une culture extrêmement rapide quasi explosive de deux à trois espèces microbiennes seulement. Il en conclut que ces espèces sont celles spécialement adaptées triomphant en compétition et seules responsables de l'ammonification dans le sol.

Voets, de Borger et Coolsaet [16] enrichissent une terre en germes zymogènes responsable de l'ammonification par percolation avec une solution de peptone. Les séparations réalisées leur ont permis de séparer différentes espèces de *Pseudomonas*, *Proteus*, *Bacillus*, *Bactérium*.

Pochon et Tchan [13] réalisent l'étude de cette microflore ammonifiante en enrichissant la terre en poudre de sang.

On suit :

— l'évolution de la flore par impression sur lamelle ;

— le dégagement d'ammoniac.

Procédant dans ces conditions écologiques, Pochon et Tchan observent que le processus d'ammonification est en réalité organisé : phase ascendante ou prédominent surtout les bactéries, phase en plateau ou les Actinomycettes viennent s'y joindre et phase décroissante caractérisée par l'envahissement fongique.

Pour Waksman [15] et son école, la technique d'ensemencement en milieu liquide sélectif n'est pas valable : elle ne permet le développement que d'espèces s'adaptant rapidement à ce milieu en leur donnant une importance exagérée. Il préconise l'emploi de méthodes microscopiques dans le sol même et pense que la grande majorité des microorganismes du sol sont capables d'attaquer les protéines. Ainsi plusieurs espèces microbiennes ont été placées, en culture pure, au contact de protéines : on dose le dégagement de NH_3 après une certaine période d'incubation : le résultat obtenu permet une détermination de bactéries aéro et anaérobies qui paraissent jouer.

dans ces conditions, un rôle effectif dans les processus d'ammonification.

Ex. : *B. Mylcoides. Proteus Vulgaris. Bacillus Subtilis, Welchia Perfringens*, etc...

En accord avec Conn [4], Waksman pense que les germes ne sporulant pas sont beaucoup plus actifs dans cette dégradation que les sporules : ainsi *Bacillus Cereus* décompose surtout les protéines en amino acides tandis que *Pseudomonas Fluorescens* dégrade surtout les amino-acides.

Si l'on fait agir un mélange de ces deux germes, la protéine est rapidement transformée en NH3 ; Waksman conclut : il est possible que différents microorganismes prennent une part active aux différentes phases de la décomposition protéique : des bactéries comme *Bacillus Cereus* peuvent être actives en début d'hydrolyse et des bactéries comme *Pseudomonas Fluorescens* sur les phases ultérieures, conduisant à la production de NH3. Nous trouvons chez cet auteur l'hypothèse d'une séparation possible de l'ammonification en plusieurs étapes avec associations microbiennes dont les unes hydrolyseraient les protéines et les autres libéreraient de l'*Ammoniac*.

La technique d'étude que nous avons précédemment décrite permet précisément de distinguer les différentes phases biochimiques de la protéolyse et donc de pouvoir isoler pour chacune d'elles, les espèces microbiennes responsables.

Nous avons dans nos différents essais effectué quotidiennement l'examen microscopique de la culture et nous avons constaté :

Fig. 1

Fig. 2

Fig. 3

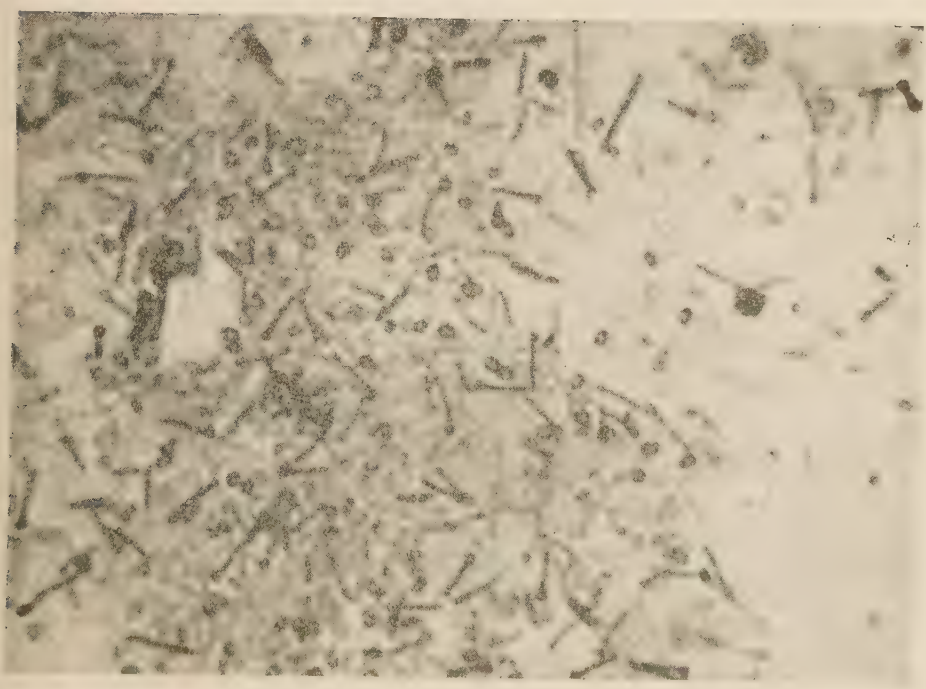


Fig. 4

L'apparition de vagues microbiennes successives d'une part, et, d'autre part, une corrélation étroite entre l'apparition des différentes variétés morphologiques microbiennes et les différentes phase de la protéolyse (cliché I).

— Une similitude dans la succession de ces différentes vagues microbiennes pour des sols d'origines très différentes.

— Dès l'ensemencement et jusqu'au 2e jour de culture nous trouvons à l'examen microscopique une culture presque pure de *Bacillus* (fig. I).

— Apparaissent ensuite des bacilles Gram + granuleux, quelques bacilles Gram — et de rares Clostridium. Cette microflore n'évolue pas tant que dure la phase de latence (Fig. II).

Dès que la dégradation active des protéines est déclenchée, nous observons une prédominance de bacilles anaérobies grêles, à grosse spore clostridienne ovale ou Plectridienne, leur concentration dans le milieu ne fait que s'accentuer (fig. III).

En fin de protéolyse nous avons surtout des spores libres (fig. IV).

Pour toutes nos terres analysées, on constate à l'examen direct la même évolution, l'apparition des plectridium et clostridium coïncidant toujours avec la période de protéolyse active. (On retrouve un aspect microscopique identique sur des frottis réalisés à partir d'un foie de cobaye enfoui dans le sol depuis quelques jours).

Dans un deuxième temps, nous avons essayé de déterminer le rôle exact de ces espèces microbiennes et les

conditions dans lesquelles elles rentrent dans le cycle de la protéolyse.

Nous avons étudié ce phénomène sur une terre arable ensemencée selon le protocole habituel, les séparations étant réalisées sur gélose nutritive-extrait de terre.

Nous avons isolé en aérobiose :

1° Un gros bacille Gram positif à spore centrale non déformante sporulant en gélose, *Mannitol* négatif.

Famille : *Bacilleae* ; Genre : *Bacillus : Bacillus cereus.*

2° Un bacille Gram positif, mobile, anaérobie facultatif ne liquéfiant pas la gélatine.

Famille : *Bactériaceae* : genre : *Kurthia* ; voisin de *Karthia variabilis.*

3° Un bacille Gram négatif. coloration bipolaire Lactose + ; Glucose +.

Famille : *Enterobacteriaceae* : tribu : *Escherichieae :* genre : *Escherichia E. Freundii.*

Nous avons isolé en anaérobiose : des bacilles grêles. Gram positif à spore subterminale appartenant au groupe des *Clostridium.*

Ces bacilles ayant été isolés en période de protéolyse active, nous les avons ensemencés en culture pure dans les milieux suivants :

V/F additionné de sérum coagulé
» » Cervelle
» » Foie
» » Lait

Nous n'avons jamais observé dans nos tubes de culture une attaque du sérum coagulé, du foie ou de la cervelle. Le lait étant, selon les espèces, coagulé entre trois et cinq jours.

De même nous avons testé le pouvoir protéolytique de ces souches en les ensemençant, en culture pure, dans notre milieu plasma-extrait de terre : nous n'avons jamais constaté une dégradation protéique.

Si nous réalisons un mélange des espèces aérobies et un ensemencement de ce mélange sur le même milieu, nous observons une légère dégradation des protéines dès le début de la culture, puis une période de latence indéfinie. Nous reproduisons les deux premières phases (début de dégradation et latence) décrites au cours de nos analyses précédentes, le phénomène s'arrête là et nous n'avons pas de phase de lyse active des protéines.

Les germes isolés en aérobiose ne réalisent pas d'attaque des protéines, leur mélange ensemencé en anaérobiose sur plasma-extrait de terre ne réalise pas non plus de clivage.

Dans une dernière expérimentation nous avons réalisé un mélange des cultures pures de ces germes aéro et anaérobies qui en culture pure n'avaient pas dégradé les protéines, et nous avons ensemencé ce mélange sur le milieu plasma-extrait de terre.

Nous avons suivi l'évolution de la flore ensemencée par un examen microscopique direct et le devenir des protéines par un dosage chimique.

Nous avons observé un enchaînement de la microflore parfaitement identique à celui constaté après ensemencement de la terre totale.

Premiers jours d'incubation : présence prépondérante dans le milieu des germes aérobies ; dès le déclenchement de la phase protéolytique vraie nous assistons à l'apparition des anaérobies sporulés qui prédominent bientôt : la solution dégage une odeur putride et la dégradation des protéines est totale. Ces germes placés au départ dans les mêmes conditions d'incubation, se développent en différentes vagues. D'abord les gros *Bacillus* et les autres germes aérobies, le protéolyse ne s'exerçant qu'en présence des Clostridium anaérobies. Tout semble se passer comme si les premiers germes hydrolisaient les protéines et que les seconds utilisent les produits de clivage.

Nous constatons donc à la faveur de cette expérimentation l'enchaînement évident de ces vagues microbiennes, nous avons démontré la nécessité de cette association et par là même le peu de crédit que nous devons accorder aux essais de mesure réalisés en culture pure. La protéolyse dans les sols constitue une chaîne biologique qui doit être étudiée comme un tout. Si l'on sépare les maillons, les résultats obtenus ne sont plus valables. Dans cette dernière partie de notre travail nous n'avons donc pas cherché à déterminer avec exactitude les différentes espèces en cause, mais nous avons plutôt voulu démontrer l'ordre dans lequel elles rentrent dans ce cycle de dégradation et prouver à travers ces analyses de sols d'origine et de nature très différentes la systématisation du phénomène.

Nous retrouvons dans nos conclusions l'idée de processus organisé décrit par POCHON et TCHAN, notre analyse correspond à la « phase ascendante bactérienne » de l'ammonification citée par ces auteurs.

Nous rejoignons d'autre part l'hypothèse de WAKSMAN d'après laquelle certaines bactéries peuvent être actives en début d'hydrolyse d'autres sur les phases ultérieures. Nous pensons enfin que notre technique d'étude permet de mieux comprendre le phénomène de la protéolyse microbienne dans les sols et de réaliser plus sûrement l'isolement des espèces qui en sont responsables.

VU : *le Président de Thèse.*
BOUISSET

VU : *le Doyen.*
LAZORTHES

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Toulouse, le 14 novembre 1962

Le Recteur,
Président du Conseil de l'Université,

P. DOTTIN

BIBLIOGRAPHIE

1. Blass et Sarraf (A.-J.). — *J. Chromat*, 1960, 3, 168.

2. Boulanger et Biserte. - La chromatographie de partage. *Exp. Ann. Bioch. Méd.* 1950, XI.

3. Breuillaud (J.). — Contribution à l'étude de la toxine Botulique A. (*Thèse d'Etat*) 1955, 64-67.

4. Bright (J.-W.), et Conn (H.-J.). — Ammonification of manure in soil. *N.Y. Agr. Expt. Sta. Tech. Bull.*, 67, 1919.

5. Chalvignac (M.-A.). — *Annales de l'Institut Pasteur*. 1953, 84, 816.

6. Fleury. — Fiches techniques - Semi-micro dosage des protéines sériques, *Sang*, 12 *bis*.

7. De Barjac (H.). — Essai d'interprétation bactério. très écologique des sols tourbeux acides. *Thèse Faculté des Sciences de Paris*, 1955.

8. Lajudie (J.) et Chavignac (M.-A.). — *Annales de l'Institut Pasteur*. 1956, T. 90, 359.

9. Lederer (E.). — Chromatographie en chimie organique et biologique III, 1960, 295, 352.

10. Loiseleur (J.). — *Techniques de laboratoire*, 1954, 638.

11. Pochon (J.). — *Manuel Technique d'analyses microbiologiques du sol*, 1954, 47-53.

12. Pochon (J.), de Barjac (H.). — *Traité de microbiologie des sols*. Applications agronomiques. 1958, 9, 229.

13. Pochon (J), Yao-Tseng-Tchan. — *Précis de microbiologie des sols*, 1948, 13, 83.

14. Prévot et Sarraf (A.). — Recherche sur les odeurs dégagées par les bactéries anaérobies. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1960, 99, 629.

15. Selman (A.), Waksman. — Soil microbiologie, 1952, 30, 94.

16. Voets, de Borger et Coolsaet. — *Rev. Ferm. et Ind. Alim.*, 1955, 10, 201.

17. Waksman (S.-A.) et Lomanitz (S.). — Contribution to the chimistry of decomposition of proteins and amino-acids by various groups of microorganisms. *J. Agr. Research*, 30, 263-281, 1924.

18. Winogradsky (S.). — *Microbiologie du sol*. 1947. 458.

19. Breuillaud (J.). — Contrôle bactériologique des préparations galéniques dérivées du sang humain. *Thèse de Doctorat d'Etat en Pharmacie*. Toulouse 1958.

20. Bouisset (L.), Breuillaud (J.), Grizou (V.). — Utilisation des protéines plasmatiques par les bactéries du sol. *C. R. des Séances de la Société de Biologie*, 1957, Cli., 7, 1426.

21. Bouisset (L.), Breuillaud (J.), Grizou (V.). — Influence des conditions climatiques sur la microflore tellurique. *Congrès des Sociétés de Pharmacie du Sud de la Loire*, in *Toulouse Pharmaceutique*, 1961.